

DEPARTAMENT DE QUIMICA ANALITICA

BIOACCESIBILIDAD DE ARSÉNICO Y MERCURIO EN  
ALIMENTOS CON POTENCIAL RIESGO TOXICOLÓGICO.

SILVIA TORRES ESCRIBANO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de maig de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Salvador Garrigues Mateo
- Dra. M<sup>a</sup> Beatriz de la Calle Guntiñas
- Dra. Mercedes Jalón González-Moreno
- Dr. José Moisés Laparra Llopis
- Dra. M<sup>a</sup> Jesús Lagarda Blanch

Va ser dirigida per:

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

©Copyright: Servei de Publicacions  
Silvia Torres Escribano

---

Dipòsit legal: V-476-2012

I.S.B.N.: 978-84-370-8201-1

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



**Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos  
con potencial riesgo toxicológico**

TESIS DOCTORAL  
Silvia Torres Escribano  
Valencia, 2011



# **Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos con potencial riesgo toxicológico**

TESIS DOCTORAL

Silvia Torres Escribano

Valencia, 2011



**Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos  
con potencial riesgo toxicológico**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:  
Silvia Torres Escribano

DIRIGIDA POR:  
Dinoraz Vélez Pacios

Valencia, 2011



CONSEJO  
SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Dinoraz Vélez Pacios, Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

## CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado “**Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos con potencial riesgo toxicológico**” presentado por Silvia Torres Escribano para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (C.S.I.C.), Paterna (Valencia), bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para ser defendido por su autora.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, expide y firma el presente informe en Valencia a 15 de Febrero de 2011

Fdo: Dra. Dinoraz Vélez Pacios

*A mis padres*

*A Marcos*

*A todos los que habéis creído en mí*

*“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable”*

Leonardo da Vinci

*“Ciencia es aquello sobre lo cual cabe siempre discusión”*

José Ortega y Gasset

*“En la investigación es incluso más importante el proceso que el logro mismo”*

Emilio Muñoz Ruiz



## **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han prestado su apoyo y colaboración durante el desarrollo de esta tesis doctoral. Sin todas y cada una de ellas, no hubiera podido finalizar este proyecto.

De modo especial quiero destacar a mi directora de tesis, Dinoraz Vélez Pacios por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y por el tiempo y esfuerzo invertido en el mismo. También quiero expresar mi especial agradecimiento a la doctora Rosa Montoro Martínez por su continuo optimismo y la gran ayuda que me ha brindado, hasta el último momento, en el desarrollo de este trabajo. Gracias de corazón.

A mi tutora de tesis M. Luisa Cervera, del Departamento de Química Analítica. Gracias por tu continuo apoyo tanto en lo laboral como en lo personal, especialmente en los momentos difíciles.

A mis compañeros de laboratorio, Moisés Laparra, Marta Calatayud, René A. Rocha, Marta Vázquez, Vicenta Devesa, Maite de la Flor y Antonio Ruiz. Gracias a todos por vuestro apoyo y sobre todo por vuestra amistad. A todas las personas que han pasado por el laboratorio 204 y que he tenido la suerte de conocer: Mariana, Merche, Inés, Raquel, Alicia, Ali, Rebeca, Blanca, María, Mari, Paula, Silvia, Mónica, Natalia, Amalia, Alejo, Julio, Luz M., Ángel, Antonio, Carlos, Aurélie, Daniela, Sergi, Xavi, Mark, Débora, Alida, Vicente y a los que seguro que se me olvidan. Gracias por vuestra ayuda.

Al laboratorio de envases, mi 2º laboratorio, especialmente a Ramón Catalá, Rafael Gavara, José María Lagarón y María José Ocio. Gracias por haberme acogido siempre como un miembro más de vuestro equipo y por haberme ayudado de una forma u otra durante todo este tiempo.

A los compañeros y vecinos del laboratorio 202 por sus préstamos, consejos y por todos los buenos momentos que hemos compartido. También al resto de compañeros y amigos del IATA, tanto a los que estuvieron de paso y a los que ya se han ido a otros centros, como a los recién llegados y por supuesto a los de siempre, Aitana, Alejandro, Alex, Álvaro, Amparo, Anke, Antonio, Bea, Carlos, Carol, Chelo, Cristina, David, Estela, Eva, Fernando, Gracia, Guada, Inma, Jader, Joaquín, Joan, Jose, Juanan, Laura, Lola, Lola A., Lorena, Mari Pau, Marian, Mariano, Mario, Miguel Ángel, Nere, Patri, Paula, Paula V., Pili, Poli, Quique, Raquel, Reme, Santi, Sergio, Toni, Vir y a todos los que se me olvidará nombrar. Todos vosotros habéis caminado a mi lado en algún momento. Espero haberos podido transmitir y agradecer a todos y cada uno lo importantes que habéis sido para mí en el día a día. Gracias a todos por vuestros ánimos y por vuestra amistad.

A Yolanda Sanz y a todo su equipo por su dedicación y colaboración en los ensayos microbiológicos.

A Antonio Martínez por su apoyo y amistad, y a todo su equipo por los diferentes préstamos instrumentales.

A Fernando López y a Laura Barrios, por su tiempo y paciencia, y por la gran ayuda que me han prestado en el complicado mundo de la estadística.

A Adolfo, Miguel y Pilar, por sus sabios consejos y por el tiempo que me han dedicado en la liofilización de las muestras del presente trabajo.

A Paco Rico, por su gran ayuda en el diseño gráfico de los posters que he presentado a congresos. A pesar de entregarle el material a última hora, siempre se ha esforzado al máximo consiguiendo un gran trabajo.

A Dani, Pepe y Vicente, por haberme facilitado siempre la búsqueda de reactivos y material, por su ayuda en la realización de las encuadernaciones y por haberme acompañado a transportar los residuos e incluso a realizar las compras.

A Nacho G., Nacho y Domingo por encontrar siempre un hueco para realizar en nuestros equipos arreglos que parecían imposibles, sin los cuales no me hubiera sido posible continuar trabajando.

A todo el equipo de recepción, especialmente a Ali y a Fran, por abrirme las puertas del IATA a horas intempestivas. Gracias también por desconectarme algún que otro equipo.

A todos los laboratorios del IATA. Seguro que en todo este tiempo me habéis prestado más de un reactivo o un equipo aunque ahora no lo recuerde concretamente. Gracias a todos.

A Reyes Barberá del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia y a todas las profesoras del departamento, especialmente a Ana Frígola, Amparo Alegría y María Jesús Lagarda por haber estado siempre dispuestas a ayudarme.

A Guillermina Font y a todo su equipo a los que tuve la suerte de conocer en un congreso. Gracias por haberme tratado tan bien.

Al Equipo de Investigación Tecnológica, Concepción, Ingeniería y Desarrollo del Alimento y del Medicamento (ERT CIDAM) del Centro de Investigación y Nutrición Humana (CRNH) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Auvergne en Clermont Ferrand con los que compartí tan buenos momentos (Marie, Agnes, Nicolas, Gyslain, Jean François) y Maha con la que coincidí de estancia en el laboratorio, y muy especialmente a Sylvain Denis, Stéphanie Blanquet-Diot y a Monique Alric por su ayuda y dedicación en los aspectos de la tesis relacionados con el sistema de digestión gastrointestinal *in vitro* TIM-1.

A mis padres y mi familia y amigos, por haberme animado a empezar y terminar la presente tesis, y por el apoyo, amor y cariño que me brindan todos los días.

A Marcos, por todo lo que me quiere y me apoya día a día. Si ha sido posible llegar hasta aquí, es sin duda gracias a él.

Finalmente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por la concesión de una Beca en el programa I3P cofinanciada con el Fondo Social Europeo y al Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos del CSIC por poner a mi disposición los medios necesarios para la realización de este trabajo.

## Resumen

El arsénico y el mercurio son elementos traza, cuyas concentraciones en alimentos deben estar controladas por las autoridades sanitarias debido a que su excesiva ingesta puede entrañar efectos perjudiciales para la salud. De entre las distintas especies químicas de ambos tóxicos existentes en los alimentos, el arsénico inorgánico y el metilmercurio constituyen las especies más tóxicas, estando considerado el arsénico inorgánico como carcinógeno tipo I para el hombre, y el metilmercurio como posible carcinogénico para el hombre, grupo 2B. El arroz, en el caso del arsénico, y los productos de la pesca en el caso del mercurio, son alimentos de alto consumo susceptibles de presentar elevadas concentraciones de estos contaminantes y pueden por ello constituir un riesgo para la salud de los consumidores.

En la estimación del riesgo toxicológico, la etapa de evaluación de la exposición tiene en cuenta la frecuencia y la magnitud de la misma. Dado que la dieta es la principal vía de entrada de arsénico y mercurio para el hombre, la evaluación de la magnitud de la exposición a ambos tóxicos debería considerar tanto la influencia del cocinado sobre la concentración del tóxico, como la biodisponibilidad oral (fracción soluble del contaminante ingerido que es absorbida por el epitelio intestinal y alcanza la circulación sistémica, hallándose así disponible para actuar en el organismo receptor). Una herramienta conservadora para la evaluación de la biodisponibilidad oral es la bioaccesibilidad, relación entre la concentración bioaccesible o soluble de una sustancia y la concentración total de la sustancia presente en la muestra. La bioaccesibilidad es indicativa de la

máxima cantidad que puede absorberse por el epitelio intestinal y por ello se utiliza como indicador de la máxima biodisponibilidad oral. Conocer la bioaccesibilidad del arsénico y mercurio desde los alimentos puede aportar información novedosa en la estimación del riesgo toxicológico. En la actualidad, para estimar la bioaccesibilidad de los contaminantes pueden utilizarse métodos de digestión gastrointestinal *in vitro* estáticos y dinámicos que emulan las etapas gástrica e intestinal de la digestión humana.

La mayoría de los estudios sobre arsénico en arroz y mercurio en pescados existentes en la bibliografía, no consideran el efecto del cocinado ni la bioaccesibilidad, limitándose a una determinación de las concentraciones de estos metales en los productos crudos. La presente tesis doctoral caracteriza las concentraciones de arsénico, mercurio y sus especies químicas de interés toxicológico en muestras de arroz y productos de la pesca, y evalúa el efecto del cocinado y de la bioaccesibilidad sobre dichas concentraciones y sobre la estimación del riesgo asumido a su consumo.

## Índice general

<b>Índice de tablas</b> .....	<b>IV</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abreviaturas y símbolos</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Objetivos</b> .....	<b>35</b>
<b>Capítulo 3. Materiales</b> .....	<b>37</b>
3.1. Muestras .....	37
3.2. Materiales de referencia .....	39
3.3. Reactivos, patrones y disoluciones .....	40
3.4. Equipo instrumental .....	47
<b>Capítulo 4. Métodos</b> .....	<b>49</b>
4.1. Determinación de arsénico total .....	49
4.2. Determinación de arsénico inorgánico mediante extracción selectiva con cloroformo .....	51
4.3. Cuantificación de especies arsenicales por HPLC-termooxidación- HG-AFS .....	53
4.4. Cuantificación de especies arsenicales mediante trampa criogénica- HG-AAS pH específica .....	56
4.5. Determinación de mercurio total .....	59
4.6. Cuantificación de metilmercurio por HPLC-termooxidación-CV- AFS .....	61
4.7. Determinación de cadmio y plomo .....	63
4.8. Método estático de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> para la estimación de la bioaccesibilidad .....	65
4.9. Método dinámico de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> para la estimación de la bioaccesibilidad (TIM-1) .....	68
4.10. Análisis estadístico .....	72

<b>Capítulo 5. Resultados .....</b>	<b>74</b>
<b>5.1. Arsénico total e inorgánico en arroces comercializados en España: efecto del cocinado y evaluación del riesgo toxicológico .....</b>	<b>74</b>
5.1.1. Arsénico total en arroz crudo .....	75
5.1.2. Arsénico inorgánico en arroz crudo .....	84
5.1.3. Arsénico inorgánico en arroz cocinado .....	89
5.1.4. Estimación del riesgo toxicológico .....	91
<b>5.2. Especies arsenicales y bioaccesibilidad en arroces comercializados en Argentina y Bolivia .....</b>	<b>97</b>
5.2.1. Arsénico total en arroz crudo .....	98
5.2.2. Arsénico inorgánico en arroz crudo .....	101
5.2.3. Riesgo toxicológico .....	108
5.2.4. Arsénico bioaccesible y especies arsenicales bioaccesibles en arroz crudo .....	114
5.2.5. Arsénico bioaccesible y especies arsenicales bioaccesibles en arroz cocinado .....	116
<b>5.3. Bioaccesibilidad de mercurio y metilmercurio en peces espada comercializados en España .....</b>	<b>120</b>
5.3.1. Mercurio total en pez espada .....	121
5.3.2. Mercurio total y metilmercurio bioaccesible en pez espada .....	125
5.3.3. Evaluación del riesgo toxicológico en base a las concentraciones en el producto crudo .....	129
5.3.4. Evaluación del riesgo toxicológico en base a las concentraciones bioaccesibles .....	139



<b>5.4. Bioaccesibilidad de mercurio en peces depredadores crudos y cocinados comercializados en España .....</b>	<b>140</b>
5.4.1. Mercurio total en pescado crudo y cocinado .....	142
5.4.2. Mercurio bioaccesible en pescado crudo y cocinado .....	146
5.4.3. Evaluación del riesgo toxicológico .....	151
<b>5.5. Comparación de un modelo de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> estático y el modelo dinámico TIM-1 para estimar la bioaccesibilidad del arsénico, cadmio, plomo y mercurio de los materiales de referencia de alimentos <i>Fucus</i> sp. (IAEA-140/TM) y hepatopáncreas de langosta (TORT-2) .....</b>	<b>154</b>
5.5.1. Bioaccesibilidad del arsénico .....	163
5.5.2. Bioaccesibilidad del cadmio .....	165
5.5.3. Bioaccesibilidad del plomo .....	167
5.5.4. Bioaccesibilidad del mercurio .....	169
<b>Capítulo 6. Conclusiones .....</b>	<b>171</b>
<b>Capítulo 7. Difusión de los resultados .....</b>	<b>175</b>
<b>Capítulo 8. Bibliografía .....</b>	<b>178</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales especies arsenicales detectadas en muestras biológicas y/o medioambientales .....	3
<b>Tabla 2.</b> Valores de $DL_{50}$ de las principales especies arsenicales .....	5
<b>Tabla 3.</b> Principales especies de mercurio .....	15
<b>Tabla 4.</b> Valores de bioaccesibilidad de As, Cd, Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) y Hg ( $\text{ng g}^{-1}$ ps) en diferentes muestras de referencia reportados en la bibliografía .....	28
<b>Tabla 5.</b> Valores de bioaccesibilidad de As, Cd, Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps o ph) y Hg ( $\text{ng g}^{-1}$ ps o ph) en diferentes muestras de alimentos reportados en la bibliografía .....	30
<b>Tabla 6.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de As mediante FI-HG-AAS .....	50
<b>Tabla 7.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de especies arsenicales mediante HPLC-termooxidación-HG-AFS .....	55
<b>Tabla 8.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de especies arsenicales mediante trampa criogénica-GH-AAS .....	58
<b>Tabla 9.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Hg mediante CV-AFS .....	60
<b>Tabla 10.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de MeHg mediante HPLC-termooxidación-CV-AFS .....	62
<b>Tabla 11.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Cd y Pb mediante GF-AAS .....	64
<b>Tabla 12.</b> Concentraciones de As total (As-t) y As inorgánico (As-i) en arroz crudos comercializados en España ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) y porcentaje que el As-i representa sobre el As-t .....	77
<b>Tabla 13.</b> Ingestas diarias de As inorgánico estimadas a partir del consumo de los arroz crudos analizados y comparación con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS .....	93

<b>Tabla 14.</b> Ingestas diarias de As inorgánico estimadas a partir del consumo de los arroces cocinados analizados y comparación con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS .....	95
<b>Tabla 15.</b> Concentraciones de As total (As-t), As inorgánico (As-i) en arroces latinoamericanos crudos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) y porcentajes de As-i con respecto al As-t .....	105
<b>Tabla 16.</b> Concentraciones de As total en arroz publicadas recientemente en la bibliografía .....	110
<b>Tabla 17.</b> Concentraciones de As inorgánico en arroz publicadas recientemente en la bibliografía .....	111
<b>Tabla 18.</b> Concentraciones de As total (As-t) y As inorgánico (As-i) en los arroces latinoamericanos crudos y concentraciones de As-t, As-i y especies arsenicales [DMA y As(V)] en la fracción bioaccesible de dichos arroces ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps) .....	115
<b>Tabla 19.</b> Concentraciones de As total (As-t) en los arroces latinoamericanos cocinados y concentraciones de As-t y especies arsenicales [As inorgánico (As-i), As(III), As(V), DMA,] en la fracción bioaccesible de dichos arroces ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ph) .....	118
<b>Tabla 20.</b> Concentraciones de Hg total (Hg-t) en muestras de pez espada, concentraciones de Hg-t bioaccesible y bioaccesibilidad de Hg-t .....	121
<b>Tabla 21.</b> Concentraciones de Hg total (Hg-t) en pez espada reportadas en la bibliografía entre 2004 y 2009 .....	124
<b>Tabla 22.</b> Comparación de la ingesta diaria de Hg total estimada en pez espada para la población española con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS .....	133
<b>Tabla 23.</b> Comparación de la ingesta diaria de MeHg estimada en pez espada para la población española con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS .....	135

<b>Tabla 24.</b> Consumo semanal de pez espada para la población española que proporcionaría ingestas de MeHg inferiores a la Ingesta Semanal Tolerable Provisional recomendada por la OMS .....	138
<b>Tabla 25.</b> Concentraciones de Hg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ph), Hg bioaccesible ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ph) y bioaccesibilidad del Hg (%) en peces depredadores españoles crudos y cocinados .....	150
<b>Tabla 26.</b> Estimación de ingestas diarias de Hg a partir del consumo de pez espada, bonito y atún y comparación con las Ingestas Diarias Tolerables recomendadas por la OMS .....	153
<b>Tabla 27.</b> Resumen de las condiciones empleadas en los métodos de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> estático (ME) y dinámico (TIM-1) .....	156
<b>Tabla 28.</b> Resultados del estudio de bioaccesibilidad en MRCs de alimentos tras la aplicación de los modelos de digestión estático (ME) y dinámico (TIM-1). Concentraciones de As, Cd, Pb y Hg en las muestras y en sus fracciones bioaccesibles, bioaccesibilidad BA (%) y relación de bioaccesibilidades ME/TIM-1 .....	158

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método estático de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	67
<b>Figura 2.</b> Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método dinámico de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> TIM-1 .	71
<b>Figura 3.</b> Concentraciones medias de As total (As-t) y As inorgánico (As-i) en arroces crudos según la región española de cultivo .....	80
<b>Figura 4.</b> Concentraciones medias de As total (As-t) y As inorgánico (As-i) en arroces crudos comercializados en España, según el país de origen ..	82
<b>Figura 5.</b> Concentraciones de As inorgánico en arroces crudos y cocinados con agua adicionada con distintas concentraciones de As(V) .....	90
<b>Figura 6.</b> Concentraciones de As total (6a) y As inorgánico (6b) en arroces latinoamericanos crudos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) de acuerdo a su zona de producción ...	112
<b>Figura 7.</b> Correlación entre las concentraciones de As total y As inorgánico en arroces latinoamericanos blancos e integrales crudos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) .....	113
<b>Figura 8.</b> Concentraciones de Hg total bioaccesible (Hg-t) y MeHg bioaccesible en las fracciones solubles de peces espada comercializados en España .....	127
<b>Figura 9.</b> Concentraciones de Hg total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) en peces depredadores españoles crudos y cocinados .....	143
<b>Figura 10.</b> Modelos de Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE) para As (a), Cd (b), Pb (c) y Hg (d) .....	161

## Abreviaturas y símbolos

<b>%</b>	Tanto por ciento
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>Ω/ft</b>	Ohms por pies
<b>AAS</b>	Espectroscopía de absorción atómica
<b>AB</b>	Arsenobetaina
<b>AESAN</b>	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
<b>AFS</b>	Espectrometría de fluorescencia atómica
<b>As(III)</b>	Arsenito
<b>As(V)</b>	Arseniato
<b>BMLD<sub>0,5</sub></b>	Dosis Benchmark de arsénico inorgánico que produce un 0,5% de incremento del cáncer de pulmón
<b>BOE</b>	Boletín Oficial del Estado
<b>CE</b>	Comisión Europea
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>d</b>	Densidad
<b>d. i.</b>	Diámetro interno
<b>DMA</b>	Ácido dimetilarsínico
<b>DORM-2</b>	Material de referencia de músculo de pez perro
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
<b>FDA</b>	Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU.
<b>g</b>	Gramo
<b>GF-AAS</b>	Espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito

<b>h</b>	Hora
<b>HG</b>	Generación de hidruros
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>ICP- MS</b>	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
<b>IDT</b>	Ingesta Diaria Tolerable
<b>ISTP</b>	Ingesta Semanal Tolerable Provisional
<b>JECFA</b>	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>m</b>	Masa
<b>M</b>	Molaridad
<b>MΩ</b>	megaohms
<b>min</b>	Minuto
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMA</b>	Ácido monometilarsónico
<b>MRC</b>	Material de Referencia Certificado
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>No.</b>	Número
<b>°C:</b>	Grado centígrado
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ph</b>	Peso húmedo
<b>ps</b>	Peso seco

<b>RASFF</b>	Sistema de Alerta Rápida para alimentos y piensos de la Unión Europea
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>T</b>	Temperatura
<b>TMA<sup>+</sup></b>	Ión tetrametilarsonio
<b>TMAO</b>	Óxido de trimetilarsina
<b>TORT-2</b>	Muestra de referencia de hepatopáncreas de langosta
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UI</b>	Unidades internacionales
<b>U.S. EPA</b>	Agencia de Protección Medioambiental de EE. UU.
<b>v</b>	Volumen
<b>w</b>	Riqueza



## Capítulo 1. Introducción Arsénico

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (corteza terrestre, suelos, agua, seres vivos). Es introducido en el medio ambiente por la erosión de las rocas, las precipitaciones, la actividad volcánica, y la combustión de materiales fósiles y bosques (Cullen y Reimer, 1989; Mandal y Suzuki, 2002; Wang y Mulligan, 2006). Se considera el vigésimo elemento más abundante de la corteza terrestre, el decimocuarto en las aguas marinas y el duodécimo en el organismo humano (Cullen y Reimer, 1989; Mandal y Suzuki, 2002). Su concentración media en la corteza terrestre se estima en  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  (Cullen y Reimer, 1989; Mandal y Suzuki, 2002).

Entre las fuentes de contaminación antropogénica de arsénico se han descrito la quema de combustibles fósiles, las actividades mineras y el empleo de derivados químicos arsenicales como herbicidas y fertilizantes (Mitchell y Barr, 1995; Robinson y Ayuso, 2004; EFSA 2009). Algunos derivados arsenicales son empleados en la preservación de la madera frente a hongos e insectos (Leist *et al.*, 2000; Mandal y Suzuki, 2002). El empleo de ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsónico (Roxarsone, ROX), ácido 4-nitro-fenilarsónico (Nitarstone, NIT) y ácido p-aminobenceno-arsónico (ácido p-arsanílico, p-ASA) para el tratamiento de enfermedades en aves de corral, ha contribuido de forma significativa a la contaminación por arsénico (Jackson y Bertsch, 2001). Aunque la Unión Europea ha prohibido el uso de estos derivados arsenicales (EC, 2003), siguen utilizándose en otras zonas del planeta.

Otras aplicaciones del arsénico son: componente de las baterías eléctricas, semiconductor, agente decolorante en la industria del vidrio, pigmento de pintura, e incluso como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades (Apostoli *et al.*, 1998; Mandal y Suzuki, 2002; Montagnani *et al.*, 2006; Choong *et al.*, 2007).

### 1.1. Especies químicas de arsénico

Las especies químicas del arsénico pueden clasificarse en dos grandes grupos: especies arsenicales inorgánicas y orgánicas. En la tabla 1 se muestran las estructuras químicas de las especies arsenicales más comunes en alimentos y muestras biológicas.

El arsenito [As(III)] y el arseniato [As(V)] son las dos especies inorgánicas mayoritarias presentes en el medio ambiente. Estas dos especies son fácilmente interconvertibles por oxidorreducción. Sin embargo, el As(V) es la especie termodinámicamente mayoritaria en condiciones oxidantes (Cullen y Reimer, 1989).

Las especies orgánicas presentan diferentes grados de metilación del átomo de arsénico: monometiladas [ácido monometilarsónico, MMA(V) y ácido monometilarsenioso, MMA(III)], dimetiladas [ácido dimetilarsínico, DMA(V) y ácido dimetilarsenioso, DMA(III)], trimetiladas [óxido de trimetilarsina (TMAO), arsenobetaina (AB) y arsenocolina (AC)] y tetrametiladas [ion tetrametilarsonio ( $\text{TMA}^+$ )]. La mayor complejidad estructural aparece en los arsenoazúcares, arsenoribofuranósidos dimetilados o trimetilados en su átomo de arsénico, y en los arsenolípidos.

**Tabla 1.** Principales especies arsenicales detectadas en muestras biológicas y/o medioambientales

<b>Arsénico inorgánico</b>	Arsenito [As(III)]	$\text{AsO}_3^{-3}$
	Óxido de arsénico (III)	$\text{As}_2\text{O}_3$
	Arseniato [As(V)]	$\text{AsO}_4^{-3}$
	Óxido de arsénico (V)	$\text{As}_2\text{O}_5$
<b>Arsénico orgánico</b>	Ácido monometilarsónico [MMA(V)]	$\text{CH}_3\text{AsO}_3^{-2}$
	Ácido monometilarsenioso [MMA(III)]	$\text{CH}_3\text{As}(\text{OH})_2$
	Ácido dimetilarsínico [DMA(V)]	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2^{-1}$
	Ácido dimetilarsenioso [DMA(III)]	$(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{OH})$
	Óxido de trimetilarsina (TMAO)	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
	Ion tetrametilarsonio ( $\text{TMA}^+$ )	$(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$
	Arsenocolina (AC)	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
	Arsenobetaina (AB)	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COOH}$
	Dimetilarsiniletanol	$(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
	Ácido dimetilarsinilacético	$(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{CH}_2\text{COOH}$
	Arsenoazúcares dimetilados R: – OH – $\text{OPO}_3\text{HCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ – $\text{SO}_3\text{H}$ – $\text{OSO}_3\text{H}$	$(\text{CH}_3)_2\text{As}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}-\text{O}-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{R}$
	Arsenoazúcares trimetilados R: – $\text{OSO}_3^-$	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}-\text{O}-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{R}$

**Tabla 1.** Continuación

<b>Arsénico orgánico</b>	Arsenolípidos	CH <sub>2</sub> OR
	R: – H (glicerofosforilarsenocolina)	 CHOR   CH <sub>2</sub> -OPO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> As <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
	R: – CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CH <sub>3</sub> (fosfatidilarsenocolina)	

## 1.2. Toxicidad

La toxicidad del arsénico depende de su forma química y de su grado de oxidación. Según los datos de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) obtenidos en animales de experimentación (tabla 2), definida como la dosis necesaria para producir la muerte del 50% de la población expuesta, la toxicidad de las especies arsenicales seguiría el orden decreciente: As(III) > As(V) > TMA<sup>+</sup> > MMA > DMA > AC > AB = TMAO. En base a estos datos se consideraba que las especies arsenicales más tóxicas eran el As(III) y el As(V) y que la metilación de estas formas inorgánicas constituía, excepto en la caso del TMA<sup>+</sup>, una vía de detoxificación. Sin embargo, el descubrimiento de las especies arsenicales trivalentes MMA(III) y DMA(III) en orina de personas expuestas a altos niveles de arsénico (Aposhian *et al.*, 2000) modificó la idea de que la metilación del arsénico inorgánico suponía su detoxificación. La especie MMA(III) puede llegar a ser hasta 26 veces más tóxica que el As(III) (Stybło *et al.*, 2000).

**Tabla 2.** Valores de DL<sub>50</sub> de las principales especies arsenicales

Especie arsenical	DL <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> peso corporal)	Animal de experimentación
As(III)	34,5 <sup>a</sup> ; 14 <sup>b</sup>	Ratas
As(V)	41 <sup>a</sup> ; 20 <sup>b</sup>	Ratas
MMA	1800 <sup>a</sup> ; (700-1800) <sup>b</sup>	Ratones
DMA	1200 <sup>a</sup> ; (700-2600) <sup>b</sup>	Ratones
AB	>10000 <sup>a,b</sup>	Ratones
AC	6500 <sup>a,b</sup>	Ratones
TMAO	10600 <sup>a</sup>	Ratones
TMA <sup>+</sup>	890 <sup>a</sup>	Ratones

<sup>a</sup> Shiomi, 1994; <sup>b</sup> Le *et al.*, 1994

Los efectos adversos del As en la salud humana han sido estudiados de forma casi exclusiva para el As inorgánico, el cual está clasificado como cancerígeno humano (Grupo I) por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002). Está constatado que su ingesta a través del agua de bebida causa cánceres de vejiga urinaria, pulmón y piel, si bien la evidencia es limitada para cánceres de riñón, hígado y próstata (WHO, 2010). Otros efectos adversos asociados con la ingesta crónica de arsénico inorgánico son retrasos en el desarrollo, enfermedades cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes (WHO, 2010). Actualmente, en la mayor parte de los continentes se han descrito zonas en la que la población está sometida a una exposición crónica a elevadas concentraciones de As inorgánico, siendo las regiones más afectadas Argentina, Chile, China, Bangladesh e India.

La FAO/OMS estableció para el As inorgánico una Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) de 15  $\mu\text{g}/\text{semana}/\text{kg}$  peso corporal (WHO, 1989). En el año 2010, se eliminó este valor de referencia toxicológico por ser del orden de la dosis Benchmark (BMLD<sub>0,5</sub>), definida como la dosis de As inorgánico que incrementa en un 0,5% la frecuencia de cáncer de pulmón. Esta BMLD<sub>0,5</sub> es de 3  $\mu\text{g}$  de As inorgánico  $\text{kg}^{-1}$  peso corporal por día (2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ -7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (WHO, 2010).

### 1.3. Exposición humana

Las principales fuentes de exposición humana al arsénico son el aire, el agua y los alimentos.

El aire, que en áreas rurales puede contener una concentración anual media de arsénico de entre 0,02 y 4  $\text{ng m}^{-3}$  (WHO, 2001a), puede llegar a constituir una fuente importante del tóxico en ciertas exposiciones ocupacionales (minería, industria azulejera, cerámica, etc). Un claro ejemplo de ello, lo constituyen las industrias cerámicas localizadas en la zona de L'Alcora (Castellón), en las que entre los años 1999 y 2003 se llegaron a alcanzar altas concentraciones de As (10 a 30  $\text{ng m}^{-3}$ ) (Alastuey *et al.*, 2000; Querol *et al.*, 2001; Querol *et al.*, 2007). Tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Unión Europea limitan las concentraciones de As en el aire. La OMS limita la concentración diaria a un valor comprendido entre  $1,5 \times 10^{-3}$  y 1  $\mu\text{g m}^{-3}$  (WHO, 2001b), mientras que la UE establece un límite máximo medio anual de 6  $\text{ng m}^{-3}$  (EC, 2004). Existen pocas investigaciones centradas en la especiación del arsénico en la atmósfera (Sánchez- Rodas *et al.*, 2007).

En el agua, la concentración media de arsénico en el mar oscila entre 1-2  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Nakazato *et al.*, 2000) y en agua dulce es  $< 10 \mu\text{g L}^{-1}$  (Mandal y Suzuki, 2002), siendo en ambas aguas mayoritarias las especies inorgánicas de As. La OMS recomienda una concentración máxima de As en el agua de bebida de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (WHO, 2008a), si bien algunos países admiten concentraciones superiores. En algunas áreas de Argentina, India y Bangladesh la población consume agua de pozo con concentraciones superiores a  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Los alimentos constituyen la principal fuente de As para el hombre. Los estudios se han centrado durante muchos años en la determinación del As total. Sin embargo, en las últimas décadas las investigaciones se han encaminado hacia la caracterización de las especies arsenicales propias de cada alimento o grupo de alimentos. Si bien el As está presente en un gran número de alimentos, en la mayoría de los casos se halla en bajas concentraciones y en su forma orgánica y menos tóxica, por lo que tradicionalmente no han sido considerados un problema para la salud.

Los productos de la pesca son el grupo de alimentos con las mayores concentraciones de As y por ello uno de los que contribuye en mayor medida a la ingesta del contaminante. Las concentraciones pueden llegar a alcanzar  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  peso húmedo (ph), superando en ocasiones los  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  (Súñer *et al.*, 2002). Sin embargo, las concentraciones de As inorgánico suelen ser inferiores a  $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$  (Sloth *et al.*, 2005; Sirot *et al.*, 2009), si bien excepcionalmente se han hallado concentraciones que superan los  $60 \mu\text{g g}^{-1}$  ps en *Mytilus edulis* L. (Sloth y Julshamn, 2008). La AB representa más del 80% del contenido de As total presente en pescados, siendo

minoritarias las concentraciones de DMA, MMA, TMAO, AC, TMA<sup>+</sup> (Súñer *et al.*, 2002; Sloth *et al.*, 2005),

Las algas son otros alimentos que también pueden presentar altas concentraciones de As. Entre ellas, destaca el alga *Hizikia fusiforme* en las que es habitual hallar concentraciones que superan los 60  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (Almela *et al.*, 2002; Laparra *et al.*, 2004; FSA, 2004), siendo aportado mayoritariamente por As inorgánico. Por ello, algunas agencias alimentarias recomiendan limitar su consumo. Otras especies presentes en las algas marinas son los arsenoazúcares dimetilados.

Respecto a los productos terrestres de origen animal, las concentraciones de As son generalmente inferiores a 0,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  y los estudios de especiación no son muy numerosos (Dabeka *et al.*, 1993; Schoof *et al.*, 1999; Cava-Montesinos *et al.*, 2003; Rudy, 2010; Blanco-Penedo *et al.*, 2010).

En los alimentos terrestres vegetales las concentraciones de As total no son elevadas. Sin embargo, el arroz presenta concentraciones de As total y As inorgánico muy superiores a las de otros vegetales y cereales (Sun *et al.*, 2008; Meharg *et al.*, 2009). Las causas de la acumulación del contaminante y las consecuencias para los consumidores han sido objeto de interés científico en los últimos años. En este cereal se centran los estudios sobre As realizados en la presente tesis doctoral.



#### 1.4. Arsénico en arroz

El arroz constituye la base de la dieta para la mitad de la población mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo en los cuales llega a aportar hasta el 70% de la energía diaria (Phuong *et al.*, 1999). Estos países producen y consumen casi el 96% del arroz, estimado en el período 2000/01 en 588,8 millones de toneladas (Childs, 2004; Hossain, 2004). Cuatro países asiáticos (China, India, Indonesia y Bangladesh) producen cerca del 70% de la producción global (Childs, 2004).

El arroz es una matriz compleja formada por carbohidratos, proteínas, grasas, fibra y minerales (Phuong *et al.*, 1999). Los carbohidratos son los componentes mayoritarios del arroz, constituyendo un 77% en peso, siendo predominante el almidón. Existe además un pequeño porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina (Champagne *et al.*, 2004). Las proteínas, mayoritariamente albúmina y globulina, suponen un porcentaje relativamente bajo en peso (7-9%) (Shih, 2003). Otros componentes, como las grasas y el agua pueden suponer un 2 y 12%, respectivamente (D'Ilio *et al.*, 2002). Este cereal presenta también componentes minoritarios de gran importancia nutricional, como minerales (P y K), vitaminas (B1, B2 y niacina), compuestos fenólicos y tocoferoles con funciones antioxidantes (Goffman y Bergman, 2004).

Este cereal, sin embargo, contiene también elementos traza tóxicos entre los cuales As, Pb y Cd han sido los más estudiados (Nriagu y Lin, 1995; Zhai *et al.*, 1996; Phuong *et al.*, 1999; D'Ilio *et al.*, 2002). Diversos trabajos realizados en la pasada década en alimentos comercializados en occidente evidenciaron que las concentraciones del As total en el arroz superaban las

halladas en otros productos de origen vegetal (Dabeka *et al.*, 1993; Yost *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 1999). Ello ha producido que en los últimos años se incrementen notablemente las investigaciones sobre este cereal, habiéndose detectado elevadas concentraciones de As en muestras comercializadas en Taiwán ( $0,76 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Williams *et al.*, 2005), Vietnam ( $0,697 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Phuong *et al.*, 1999) y Australia ( $0,776 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Phuong *et al.*, 1999).

Los niveles de As en el grano están influenciados por las condiciones de cultivo, habiéndose demostrado que existe un incremento del As con el aumento del As en el agua de riego (Abedin *et al.*, 2002) o en el suelo (Xie y Huang, 1998). Por ello, en las áreas contaminadas con As, como el sudeste de Asia, la contaminación del arroz por As ha sido considerada como un desastre (Meharg, 2004).

Las especies arsenicales presentes en el arroz son DMA, As(III) y As(V). El MMA aparece en bajas concentraciones, no detectándose en gran parte de las muestras. Las investigaciones sobre As inorgánico en arroz son escasas en comparación con la extensa caracterización realizada sobre las concentraciones en As total.

Las concentraciones de As inorgánico en el arroz podrían representar un daño potencial para el consumidor, pero para una evaluación más realista del riesgo asociado al consumo de este cereal, debería estudiarse el efecto del cocinado así como de su biodisponibilidad en las concentraciones del tóxico. La preparación del arroz generalmente se realiza por cocción en agua, y en el caso de utilizar agua contaminada con As, el cocinado incrementa la concentración de As en el alimento (Bae *et al.*, 2002; Ackerman *et al.*, 2005; Laparra *et al.*, 2005). En áreas asiáticas en las que la

población emplea para fines culinarios agua con elevada concentración en As, el cocinado podría convertir al arroz, grano consumido varias veces al día, en una fuente de As inorgánico tan importante como el agua de bebida, y en el alimento con mayor contribución a la ingesta humana de As.

## Capítulo 1. Introducción Mercurio

Debido a los trágicos episodios de intoxicación humana por mercurio en Japón (Minamata y Niigata, 1953, 1960 y 1965), Irak (1972) y Colombia (Mamonal, 1975), las autoridades sanitarias de todo el mundo defienden distintas estrategias para reducir los niveles de mercurio en el medio ambiente y restringir las fuentes de exposición para los humanos.

Al igual que ocurría con el arsénico, el mercurio se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Las concentraciones de mercurio en el medio ambiente pueden verse modificadas por la acción de fenómenos naturales y por la actividad humana.

La mayor fuente natural de mercurio a la atmósfera la constituyen los procesos de desgasificación de la corteza terrestre a través de los gases liberados por las erupciones volcánicas y la solubilización de rocas, suelos y sedimentos (WHO, 2008a). El mercurio se considera el sexagésimo segundo elemento más abundante de la corteza terrestre. Su concentración media en la corteza terrestre se estima en  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Aylett, 1973).

La contaminación por mercurio a partir de las fuentes antropogénicas se debe principalmente a las actividades mineras (Hylander y Meili, 2003; WHO 2008b). El distrito minero de Almadén (Ciudad Real, España) constituye la concentración natural más grande y más antigua del mundo de este elemento (Hylander y Meili, 2003; Higuera *et al.*, 2003, 2006). Otra actividad industrial que contribuye a la emisión de mercurio a la atmósfera

es la quema de combustibles para la generación de calor y de electricidad (WHO, 2008b).

El mercurio también ha sido ampliamente empleado como catalizador en la producción de vinilo, como fungicida y como componente de pinturas y jabones, amalgamas dentales y distintos aparatos eléctricos como baterías, termómetros, barómetros, etc. (WHO, 2008b). Su uso en termómetros y otros instrumentos de medida ha sido prohibido o restringido en algunos casos de acuerdo a la Directiva 2007/51/EC (EC, 2007).

## 2.1. Especies químicas de mercurio

Al igual que el arsénico, las especies químicas del mercurio tienen distintas propiedades físico químicas y toxicidad. En la tabla 3 se muestran las estructuras químicas de las especies de mercurio más comunes.

El mercurio existe en tres estados de oxidación:  $\text{Hg}^0$  [mercurio metálico  $\text{Hg}(0)$ ],  $\text{Hg}^{+2}$  [mercurio mercurioso,  $\text{Hg}(\text{I})$ ] y  $\text{Hg}^{+2}$  [mercurio mercúrico,  $\text{Hg}(\text{II})$ ]. El mercurio puede formar sales inorgánicas, como cloruros, nitratos y sulfatos, y compuestos organometálicos. Los compuestos orgánicos se caracterizan por el enlace del mercurio a uno o dos átomos de carbono orgánico y X puede ser cualquier anión.

Las especies más abundantes en el medio ambiente son  $\text{Hg}(0)$ ,  $\text{Hg}(\text{II})$  y los compuestos orgánicos monometilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) y dimetilmercurio ( $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$ ). Por acción microbiológica y abiótica se producen transformaciones de las especies de mercurio en la atmósfera y en los ecosistemas terrestres y acuáticos, existiendo un ciclo global del mercurio.

El vapor de mercurio constituye el 99% del mercurio presente en la atmósfera. Es un gas estable con propiedades similares a las de un gas noble, y su permanencia en la atmósfera es igual o superior a un año. Posiblemente por acción del ozono se produce la oxidación del Hg(0) a Hg(II), especie que por efecto de la lluvia se deposita en los ecosistemas terrestres o acuáticos.

El Hg(0) puede ser oxidado a Hg(II) en presencia de materia orgánica, y posteriormente puede ser reducido a Hg(0) en condiciones reductoras apropiadas. Por otra parte, el Hg(II) puede ser metilado por la acción de bacterias anaeróbicas generando monometil y dimetilmercurio (Boening, 2000). Una parte de los compuestos metilados puede ser eliminada a la atmósfera (Clarkson, 1998), pero la mayoría se bioacumula como monometilmercurio a lo largo de la cadena trófica acuática, constituyendo los organismos de agua dulce y salada la principal vía de exposición al monometilmercurio para el hombre (Horvat, 2001).

**Tabla 3.** Principales especies de mercurio

<b>Mercurio inorgánico:</b>	Elemental Hg(0)	$\text{Hg}^0$
	Mercurioso Hg(I)	$\text{Hg}_2^{+2}$
	Mercúrico Hg(II)	$\text{Hg}^{+2}$
	Sales inorgánicas de mercurio	
	X: $-\text{OH}^-$ , $-\text{CN}^-$ , $-\text{Cl}^-$ , $-\text{Br}^-$	$\text{HgX}_2$
		$\text{HgX}_3^-$
		$\text{HgX}_4^{2-}$
<b>Mercurio orgánico:</b>	Monometilmercurio ( $\text{MeHg}^+$ )	$\text{CH}_3\text{Hg}^+$
	Dimetilmercurio ( $\text{Me}_2\text{Hg}$ )	$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$
	Etilmercurio ( $\text{EtHg}^+$ )	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$
	Fenilmercurio ( $\text{PhHg}$ )	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$

## 2.2. Toxicidad

La toxicidad del Hg para el hombre depende de la vía de exposición (inhalación, ingestión o absorción dérmica) y de la forma química en que éste se encuentre. Los compuestos de MeHg están considerados por la IARC como posiblemente carcinogénicos para humanos (Grupo 2B; IARC, 1993). Se ha evidenciado que el MeHg produce efectos neurológicos adversos como retraso mental, convulsiones, pérdida de visión y del oído, retraso en el desarrollo, desórdenes en el lenguaje y pérdida de memoria (WHO, 2007). La exposición prenatal al mercurio puede producir

alteraciones en el desarrollo neurológico de los niños (Gao *et al.*, 2007; Jedrychowski *et al.*, 2007).

La FAO/OMS estableció para el Hg una Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) de 5  $\mu\text{g}/\text{semana}/\text{kg}$  peso corporal y de 1,6  $\mu\text{g}/\text{semana}/\text{kg}$  de peso corporal para MeHg (WHO, 2003). Recientemente se ha retirado la ISTP para el Hg total y se ha establecido una ISTP de Hg inorgánico de 4  $\mu\text{g}/\text{semana}/\text{kg}$  peso corporal aplicable a la exposición alimentaria para alimentos distintos de pescado y marisco. Para la exposición alimentaria a Hg de estos alimentos debería ser de aplicación la ISTP establecida anteriormente para el MeHg (WHO, 2010).

### 2.3. Exposición humana

El hombre puede estar expuesto al mercurio a través del aire, el agua y los alimentos, siendo estos últimos la mayor fuente de exposición al contaminante.

Con respecto a la concentración de Hg en el aire, los niveles habituales oscilan entre 2-10 ng de Hg  $\text{m}^{-3}$  (WHO, 2005). La U.S. EPA estableció un nivel de Hg elemental para evaluar el posible riesgo de exposición por inhalación de 0,3  $\mu\text{g m}^{-3}$  basado en el nivel más bajo al que se observa efecto tóxico (LOAEL) (U.S. EPA, 1999). Se ha estimado que la cantidad de Hg en la atmósfera es de  $10^8$  g y que entre un 40% y un 75% del Hg atmosférico actual es de origen antropogénico (Gaona, 2004).

El mercurio se moviliza de la atmósfera principalmente a través de las precipitaciones. Los niveles de Hg en el agua de lluvia pueden oscilar entre 5-100 ng  $\text{L}^{-1}$  (WHO, 2005). La especie química de mercurio presente en el



agua es principalmente Hg(II). Las concentraciones de Hg en las aguas superficiales son muy bajas y oscilan entre 0,5-3 ng L<sup>-1</sup> en océanos y 2-15 ng L<sup>-1</sup> en aguas costeras (WHO, 1990). De forma natural, los niveles habituales de Hg en aguas subterráneas y superficiales son inferiores a 0,5 µg L<sup>-1</sup>, aunque pueden hallarse concentraciones superiores en aguas subterráneas por la presencia en la zona de yacimientos de menas de Hg (WHO, 2005). Según la U.S. EPA, el nivel máximo de mercurio inorgánico en el agua de bebida debería de ser de 0,002 mg L<sup>-1</sup> (U.S. EPA, 2010) mientras que el contenido recomendado por la OMS es de 0,006 mg L<sup>-1</sup> (WHO, 2008a).

Las concentraciones en la mayoría de alimentos son bajas e inferiores al límite máximo de 20 µg de Hg inorgánico kg<sup>-1</sup> ph establecido por la OMS (WHO, 1990). Pueden hallarse concentraciones superiores en los vegetales cultivados en suelos contaminados. Así, por ejemplo, se han hallado concentraciones de mercurio de 40 µg kg<sup>-1</sup> ph en lechugas (Reilly, 2002) y de 569 µg kg<sup>-1</sup> en arroz (Horvat *et al.*, 2003). Recientemente, se han reportado concentraciones de mercurio en el hongo comestible *Boletus pinophilus* de hasta 6,9 µg kg<sup>-1</sup> ps (Melgar *et al.*, 2009).

Los productos cárnicos, principalmente las vísceras, pueden contener altos niveles de mercurio. Se han reportado en la bibliografía concentraciones de entre 1-136 µg kg<sup>-1</sup> en riñón y entre 7-14 µg kg<sup>-1</sup> en hígado de ganado vacuno holandés (Reilly, 2002). Otros grupos de alimentos pueden acumular importantes concentraciones de mercurio tal y como se ha puesto de manifiesto en la bibliografía. Por ejemplo, se han reportado concentraciones de mercurio de hasta 29 µg kg<sup>-1</sup> en huevos de

gallinas alimentadas con compuestos mercuriales (MAFF, 1987) y más recientemente un queso Gata-Hurdes ha presentado una concentración de mercurio de  $208,3 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Moreno-Rojas *et al.*, 2010).

Los productos de la pesca constituyen una excepción, ya que pueden presentar concentraciones de mercurio de hasta  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ . Son los alimentos que contribuyen en mayor medida a la ingesta de Hg por el hombre y van a ser los alimentos objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

## 2.4. Mercurio en pescados

El consumo de pescado constituye para el hombre una excelente fuente de proteínas y de oligoelementos como yodo y selenio. Además, algunas especies de pescados grasos aportan cantidades significativas de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 [ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA)] que resultan beneficiosos en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Fussenegger *et al.*, 2007). Sin embargo, el pescado puede constituir también una fuente de sustancias nocivas para el organismo, al contener bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y metilmercurio (Virtanen *et al.*, 2007).

En la actualidad, se considera que el consumo de pescado constituye la principal fuente de exposición humana al mercurio (EFSA, 2004). Son los peces depredadores marinos que ocupan altos niveles en la cadena trófica, como el pez espada, tiburón y atún, los de mayor concentración en Hg, del cual aproximadamente el 90% existe en su forma metilada (metilmercurio),

siendo aportado el resto por pequeñas o indetectables cantidades de mercurio inorgánico [Hg(II)], etilmercurio y fenilmercurio (Branco *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007). La proporción MeHg/Hg es menor en peces de agua dulce (WHO, 2008b). Debido a las altas concentraciones que presentan algunas especies de pescado, tanto la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como la Administración de Drogas y Medicamentos de EE. UU. (FDA) y la Agencia de Protección Medioambiental (U.S. EPA), han aconsejado a los grupos de población vulnerables (mujeres embarazadas o que pueden llegar a estarlo, mujeres en fase de lactancia y niños de corta edad) evitar algunos tipos de pescado que podrían acumular niveles altos de MeHg.

En los últimos años se han incrementado considerablemente los estudios sobre la seguridad alimentaria del Hg presente en los productos de la pesca. Así, se han cuantificado Hg total y MeHg en distintas especies de pescados (Mira *et al.*, 2005; Morgano *et al.*, 2005; Burger y Gochfeld, 2006; Sivaperumal *et al.*, 2006; Afonso *et al.*, 2007; Cortes y Fortt, 2007); se ha evaluado la influencia de las características fisiológicas del pescado sobre dichas concentraciones (Monteiro y Lopes, 1990; Afonso *et al.*, 2007; Storelli *et al.*, 2007) y se han calculado las ingestas del tóxico para poblaciones infantiles y adultas (Llobet *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2005; Falcó *et al.*, 2006; Farias *et al.*, 2006; Martí-Cid *et al.*, 2007; Sahuquillo *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2008; Rodellar *et al.*, 2010).

Cuando son los alimentos la vía de entrada del contaminante, la evaluación de la exposición debería considerar la concentración del tóxico en los productos tal y como son consumidos por la población. Sin embargo,

para el Hg, al igual que para otros elementos traza tóxicos, la evaluación de la ingesta se lleva a cabo, en muchas ocasiones, en base a las concentraciones del contaminante en el producto crudo. Hasta el momento actual, la mayoría de estudios de ingesta de Hg de la población española han utilizado las concentraciones en pescados crudos (Bocio *et al.*, 2005; Falcó *et al.*, 2006; Martí-Cid *et al.*, 2007; Yusà *et al.*, 2008; Herreros *et al.*, 2008, Rodellar *et al.*, 2010). Únicamente los estudios de dieta total llevados a cabo en el País Vasco estiman ingestas a partir de productos cocinados (Urieta *et al.*, 1996).

Las escasas investigaciones realizadas sobre el efecto del cocinado en la concentración de Hg en pescado no aportan conclusiones claras. Entre los estudios más recientes que evalúan el efecto de distintos procedimientos de cocinado, únicamente Chicourel y colaboradores (2001) comparan los resultados en peso seco, poniendo de manifiesto que la fritura y la cocción no afectan a los niveles iniciales de Hg en tiburón azul. Otros estudios comparan los resultados en peso húmedo (ph), hallando que la mayoría de las combinaciones (procedimiento de cocinado-pescado) producen un incremento en las concentraciones de Hg (Morgan *et al.*, 1997; Burger *et al.*, 2003; Perelló *et al.*, 2008). También ha sido reportado que con otras prácticas de cocinado no hubo alteración en la concentración de Hg, o que la concentración disminuyó (Perelló *et al.*, 2008). Estos estudios parecen indicar que la concentración en el pescado cocinado podría depender de la combinación procedimiento de cocinado-pescado.

Al igual que se ha comentado para el arsénico en el arroz, una evaluación más realista del riesgo toxicológico que conlleva la ingesta de Hg a través

del consumo de pescado, debería considerar no sólo la concentración de Hg en el producto tal y como lo consume la población, cocinado en la mayoría de productos de la pesca, sino también su biodisponibilidad.

## Capítulo 1. Introducción Bioaccesibilidad

La evaluación del riesgo toxicológico conlleva en su etapa de exposición el establecimiento de la duración, frecuencia y magnitud de la exposición a un contaminante químico (WHO, 2008b). Cuando son los alimentos la vía de entrada del contaminante, la evaluación de la magnitud de la exposición al tóxico debería llevarse a cabo considerando la biodisponibilidad oral, es decir la “fracción de una dosis administrada que alcanza el compartimento central (sangre) desde el tracto gastrointestinal” (Wragg y Cave, 2002), también conocida con el término de biodisponibilidad absoluta.

Una herramienta conservativa para evaluar la biodisponibilidad oral es la bioaccesibilidad oral, definida como “la fracción soluble en el tracto gastrointestinal que está disponible para su absorción” (Wragg y Cave, 2002). La bioaccesibilidad es indicativa de la máxima biodisponibilidad oral y por ello es una herramienta útil en la estimación del riesgo (Intawongse y Dean, 2006). En los últimos años, la evaluación de la bioaccesibilidad ha adquirido especial relevancia. Estudios en suelos han mostrado la idoneidad de la evaluación de la concentración bioaccesible gástrica, intestinal o gastrointestinal mediante métodos *in vitro* para predecir la biodisponibilidad *in vivo* de As, Cd y Pb (As: Rodríguez *et al.*, 1999; Juhasz *et al.*, 2007; Nagar *et al.*, 2009; Cd: Schroder *et al.*, 2003; Pb: Ruby *et al.*, 1996).

Se han llevado a cabo diversos estudios *in vivo* empleando modelos animales para evaluar la biodisponibilidad de As, Cd y Pb. La mayoría de estos trabajos han sido realizados en suelos: As (Ruby *et al.*, 1996, Ellickson *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 1999, 2003; Juhasz *et al.*, 2007; Nagar *et al.*,

2009); Cd (Schroder *et al.*, 2003); Pb (Freeman *et al.*, 1996; Ruby *et al.*, 1996; Casteel *et al.*, 1997; Ellickson *et al.*, 2001). El número de estudios *in vivo* llevados a cabo en alimentos es muy escaso (Juhasz *et al.*, 2006, 2008). Sin embargo, “para complementar o reemplazar el uso de animales en la determinación de la biodisponibilidad de elementos potencialmente tóxicos para la salud humana, o para estimar la biodisponibilidad cuando los estudios en animales no están disponibles, pueden diseñarse estudios *in vitro*” (Wragg y Cave, 2002). A nivel de laboratorio, estos métodos emulan las condiciones fisiológicas que tienen lugar en la digestión gastrointestinal y pueden predecir la bioaccesibilidad oral de los metales. Estos métodos *in vitro* permiten analizar un elevado número de muestras y una vez validados, generan datos precisos y reproducibles sin restricciones éticas (Yoo y Chen, 2006).

Los modelos estáticos *in vitro* realizan una exposición secuencial para simular la digestión en diferentes compartimentos (boca, estómago, e intestino o combinaciones de los mismos). La selección de los compartimentos varía de acuerdo al método estático empleado, siendo los que emulan secuencialmente el estómago y el intestino delgado los más frecuentes. Las condiciones fisiológicas humanas como pH, enzimas gástricas e intestinales, temperatura y tiempos de residencia son emuladas durante la aplicación de estos métodos.

Los modelos dinámicos *in vitro* reproducen de forma más precisa el tránsito gradual de los componentes ingeridos a través del tracto gastrointestinal y simulan la digestión gastrointestinal *in vivo*. El modelo dinámico TIM (TNO Gastrointestinal Model) es un sistema dinámico

multicompartimental controlado por ordenador que simula las condiciones de digestión en cuatro compartimentos; estómago, duodeno, yeyuno e íleo para TIM-1 (Minekus *et al.*, 1995) y también el colon para TIM-2 (Minekus *et al.*, 1999). Las condiciones simuladas en la digestión mediante TIM-1 son reproducibles y concordantes con los datos *in vivo* y los experimentos de validación, han demostrado el valor predictivo del sistema para evaluar la disponibilidad en la absorción humana de minerales, vitaminas y mutágenos de alimentos (Blanquet *et al.*, 2004). Otro modelo dinámico *in vitro* utilizado es el SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), que simula las condiciones fisicoquímicas, enzimáticas y microbiológicas en estómago, intestino delgado y varias regiones del colon (Yoo y Chen, 2006; Laird *et al.*, 2009 a,b; Cave *et al.*, 2010).

Los modelos estáticos *in vitro* anteriormente comentados se han empleado para estudiar la bioaccesibilidad de una gran variedad de nutrientes (tocoferoles, ácidos grasos, carotenoides y vitaminas), y tóxicos (metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas y fenoles). Con respecto a los elementos traza tóxicos en alimentos, los estudios no son muy numerosos. Como muestra la tabla 4, se han empleado varios modelos estáticos para determinar la bioaccesibilidad del As, Cd y Pb en materiales de referencia certificados (MRCs). En el caso de alimentos propiamente dichos (tabla 5), se ha evaluado la bioaccesibilidad del As en algas, arroz, píldoras chinas y productos de la pesca. Para Cd y Pb, se ha estudiado la bioaccesibilidad en matrices vegetales y en productos de la pesca. Por lo que respecta a la bioaccesibilidad del Hg, las investigaciones se han centrado en pescados.



El modelo dinámico *in vitro* TIM-1 ha sido aplicado para el estudio del comportamiento de distintas formas de dosificación de drogas (Blanquet *et al.*, 2004) y el desarrollo de formulaciones farmacéuticas (Blanquet *et al.*, 2005). En nutrientes, se ha empleado para el estudio de la biodisponibilidad de productos lácteos fortificados en folato (Verwei *et al.*, 2006) y de los parámetros que influyen la estabilidad frente a la digestión de los carotenoides (Blanquet-Diot *et al.*, 2009). El modelo TIM-1 también ha sido empleado para evaluar la bioaccesibilidad del As, Cd y Pb en suelos (Oomen *et al.*, 2002; Van de Wiele *et al.*, 2007). No tenemos conocimiento de que se haya empleado TIM-1 para estimar la bioaccesibilidad de estos contaminantes en MRCs de alimentos, ni en alimentos propiamente dichos. El modelo dinámico SHIME ha sido utilizado para evaluar la bioaccesibilidad de Hg de alimentos tradicionales de esquimales del Norte de Canadá (Laird *et al.*, 2009a).

En la actualidad, el empleo de modelos de digestión *in vitro* para evaluar el riesgo asociado a la exposición oral de metales a través del suelo está muy extendido. Diversos grupos de investigación han llevado a cabo trabajos centrados en el estudio de los diversos factores que influyen en la bioaccesibilidad de los metales a partir de suelos (compartimentos de digestión, pH, porcentaje sólido/líquido, tiempos de residencia en estómago e intestino, uso de estimulantes alimentarios, etc) (Wragg y Cave, 2002). Otros grupos de investigación se han centrado en la validación de un método de digestión *in vitro* para la evaluación de la bioaccesibilidad de suelos, alimentos y juguetes (Versantvoort, 2004). Actualmente existe una norma ISO para evaluar la bioaccesibilidad desde los suelos (BARGE,

2010). No ocurre lo mismo, sin embargo, para los metales existentes en los alimentos.

Sería conveniente emular para metales en alimentos, la trayectoria llevada a cabo en suelos antes de introducir la bioaccesibilidad como una herramienta en la estimación de la exposición a través de los alimentos. En este sentido habría que tener en cuenta varios aspectos:

- No existen estudios en alimentos que comparen los resultados obtenidos por varios métodos *in vitro*, a diferencia de la gran cantidad de información disponible en muestras de suelos (Oomen *et al.*, 2002; Van de Wiele *et al.*, 2007; Hagens *et al.*, 2009; Cave *et al.*, 2010).
- Se ha demostrado que la especiación es importante en el conocimiento de la bioaccesibilidad de metales. Las múltiples formas minerales de As y Pb que constituyen la composición mineralógica del suelo condicionan la bioaccesibilidad de estos elementos tal y como han puesto de manifiesto Ruby y colaboradores (1996) y más recientemente Meunier y colaboradores (2010). Como ejemplo de ello, cuando el As en el suelo se halla asociado con calcio y hierro, su bioaccesibilidad es superior al 49%, mientras que cuando se encuentra en forma de scorodita y arsenopirita, la bioaccesibilidad es inferior al 1% (Meunier *et al.*, 2010). En alimentos, debería considerarse también la especiación como un factor que podría condicionar los resultados de bioaccesibilidad obtenidos con cada método *in vitro*.
- Dada la gran variedad de métodos de digestión *in vitro* existentes y la variabilidad de las condiciones empleadas en ellos, los datos obtenidos

resultan difíciles de comparar, como han puesto de manifiesto diversos autores (Oomen *et al.*, 2002).

- Los resultados recogidos en las tablas 4 y 5 indican que los estudios no son muy elevados y sería de interés aportar más datos al respecto. Un estudio exhaustivo de estas matrices alimentarias podría apoyar el uso de la bioaccesibilidad con fines a la evaluación del riesgo.

- El efecto del cocinado y de los concomitantes alimentarios sobre la biodisponibilidad de los metales han sido aspectos muy poco abordados en la bibliografía (Morgan *et al.*, 1997; Chicourel *et al.*, 2001; Shim *et al.*, 2009).

**Tabla 4.** Valores de bioccesibilidad de As, Cd, Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps) y Hg ( $\text{ng g}^{-1}$ , ps) en diferentes muestras de referencia reportados en la bibliografía

MRC	Concentración certificada	Concentración hallada <sup>a</sup>	Método de digestión	Etapas	Valores bioaccesibles <sup>b</sup>	Bioaccesibilidad <sup>c</sup>	Referencia
<b>As</b> $\mu\text{g g}^{-1}$ ps							
DORM-2	$18,0 \pm 1,1$	$17,5 \pm 0,8$	ME <sup>d</sup>	GI <sup>e</sup>	$17,1 \pm 1,8$	98	Laparra <i>et al.</i> , 2007
TORT-2	$21,6 \pm 1,8$	—	ME en lotes	Saliva + GI	—	52	Dufailly <i>et al.</i> , 2008
			ME en línea	Saliva + GI	—	40	
DOLT-3	$10,2 \pm 0,5$	—	ME en lotes	Saliva + GI	—	69	Dufailly <i>et al.</i> , 2008
			ME en línea	Saliva + GI	—	42	
DORM-3	$6,88 \pm 0,30$	—	ME en lotes	Saliva + GI	—	57	Dufailly <i>et al.</i> , 2008
			ME en línea	Saliva + GI	—	59	
CRM 627	$4,8 \pm 0,3$	—	ME en lotes	Saliva + GI	—	53	Dufailly <i>et al.</i> , 2008
			ME en línea	Saliva + GI	—	42	

**Tabla 4.** Continuación

MRC	Concentración certificada	Concentración hallada <sup>a</sup>	Método de digestión	Etapas	Valores bioaccesibles <sup>b</sup>	Bioaccesibilidad <sup>c</sup>	Referencia
<b>Cd</b> ug g <sup>-1</sup> ps							
SRM1570a	2,89 ± 0,07	2,73 ± 0,37	ME	GI	1,66	61	Intawongse y Dean, 2008
INCT-TL-1	0,0302 ± 0,004	0,0381 ± 0,0116	ME	GI	0,0197	52	Intawongse y Dean, 2008
<b>Pb</b> ug g <sup>-1</sup> ps							
SRM1570a	—	0,392 ± 0,076	ME	GI	0,23	61	Intawongse y Dean, 2008
INCT-TL-1	1,78 ± 0,24	1,73 ± 0,05	ME	GI	0,33	19	Intawongse y Dean, 2008
<b>Hg</b> ng g <sup>-1</sup> ps							
—	—	—	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> Valores totales expresados como media ± SD

<sup>b</sup> Valores bioaccesibles de cada contaminante en cada matriz tras la aplicación de cada método de digestión

<sup>c</sup> Bioaccesibilidad =  $\frac{\text{valor bioaccesible tras la aplicación del método de digestión}^b}{\text{concentración total en cada matriz}^a} \times 100$

<sup>d</sup> ME: método estático de digestión *in vitro*

<sup>e</sup> GI: gastrointestinal

**Tabla 5.** Valores de bioccesibilidad de As, Cd, Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps o ph) y Hg ( $\text{ng g}^{-1}$ , ps o ph) en diferentes muestras de alimentos reportados en la bibliografía

Muestra	Concentración hallada (ps o ph) <sup>a</sup>	Método de digestión	Etapas	Valores bioaccesibles (ps o ph) <sup>b</sup>	Bioaccesibilidad <sup>c</sup>	Referencia
<b>As</b>	<b><math>\mu\text{g g}^{-1}</math> ps</b>					
<i>Alga Enteromorpha</i>	2,9 $\pm$ 0,1 ps	ME <sup>d</sup>	GI <sup>e</sup>	0,928 $\pm$ 0,07 ps	32	Laparra <i>et al.</i> , 2003
<i>Porphyra</i> sp. cruda	33,8 $\pm$ 2,9 ps	ME	GI	22,7 $\pm$ 1,3 ps	67	
<i>Porphyra</i> sp. al horno		ME	GI	25,4 $\pm$ 0,9 ps	80	
<i>Hizikia fusiforme</i> cruda	99,4 $\pm$ 4,0 ps	ME	GI	61,9 $\pm$ 2,3 ps	62	
<i>Hizikia fusiforme</i> hervida		ME	GI	42,9 $\pm$ 2,4 ps	66	
<i>H. fusiforme</i> cruda	125-131,7 ps	ME	GI	69,9 $\pm$ 3,2 a 97,3 $\pm$ 3,3 ps	56-74	Laparra <i>et al.</i> , 2004
<i>H. fusiforme</i> hervida		ME	GI	51,1 $\pm$ 3,1 a 57,1 $\pm$ 2,5 ps	32-36	
<i>H. fusiforme</i> hervida	104-132 ps	ME	GI	69,9 $\pm$ 3,2 ps	53	Almela <i>et al.</i> , 2005
<i>H. fusiforme</i> lavada/hervida	56-94 ps	ME	GI	53,8 $\pm$ 2,3 ps	57	

**Tabla 5.** Continuación

Muestra	Concentración hallada (ps o ph) <sup>a</sup>	Método de digestión	Etapas	Valores bioaccesibles (ps o ph) <sup>b</sup>	Bioaccesibilidad <sup>c</sup>	Referencia
As	µg g <sup>-1</sup> ps					
<i>Undaria pinnatifida</i> cruda	47-49 ps	ME	GI	18,3 ± 1,2 ps	38	Almela <i>et al.</i> , 2005
<i>Undaria pinnatifida</i> lavada/hervida	34-50 ps	ME	GI	—	—	
<i>Porphyra</i> sp. cruda	27-34 ps	ME	GI	23,7 ± 0,3 ps	87	
<i>Porphyra</i> sp. cocinada al horno/tostada	26-33 ps	ME	GI	27,8 ± 0,7 ps	106	
Polvo de Kelp	27,65 ± 0,38 ps	ME	GI	12,5 ± 0,7 ps	45	
Arroces crudos	0,05-0,53 ps	ME	GI	—	—	Laparra <i>et al.</i> , 2005
Arroces cocinados	0,88-4,21 ps	ME	GI	1,06-3,93 ps	83-120	
Lenguado crudo	24,8 ± 1,4 ps	ME	GI	24,4 ± 2,4 ps	98	Laparra <i>et al.</i> , 2007
Lenguado asado	23,0 ± 1,6 ps	ME	GI	23,5 ± 0,6 ps	102	
Mero de Groenlandia crudo	4,80 ± 0,04 ps	ME	GI	3,8 ± 0,3 ps	79	
Mero de Groenlandia al microondas	4,40 ± 0,07 ps	ME	GI	4,4 ± 0,4 ps	100	

**Tabla 5.** Continuación

Muestra	Concentración hallada (ps o ph) <sup>a</sup>	Método de digestión	Etapas	Valores bioaccesibles (ps o ph) <sup>b</sup>	Bioaccesibilidad <sup>c</sup>	Referencia
<b>As</b> <b>µg g<sup>-1</sup> ps</b>						
Cangrejos control	7,0-7,9 ph	ME	GI	6,9 ± 0,4 ph	88	Koch <i>et al.</i> , 2007a
Cangrejos SH	218-228 ph	ME	GI	95 ± 8 ph	44	
Algas control	6-10 ph	ME	GI	5,2 ± 0,5 ph	76	
Algas SH	23-43 ph	ME	GI	21 ± 3 ph	79	
Pildoras chinas	70000 ph	ME	GI	3000 ph	4	Koch <i>et al.</i> , 2007b
<b>Cd</b> <b>µg g<sup>-1</sup> ps</b>						
Moluscos comestibles	0,04-4,2 ph	ME	Saliva + GI	—	20-84	Amiard <i>et al.</i> , 2008
Polvo cacao	0,13-0,74 ps	ME	GI enzimática	—	24-41	Mounicou <i>et al.</i> , 2002
Licor de cacao	0,48-1,1 ps	ME	GI + enzimática	—	29-30	
Lechuga	4,07-8 ph	ME	GI	—	51-56	Chan <i>et al.</i> , 2007
Grano de trigo candéal	1,70-2,75 ph	ME	GI	—	11-13	



**Tabla 5.** Continuación

Muestra	Concentración hallada (ps o ph) <sup>a</sup>	Método de digestión	Etapas	Valores bioaccesibles (ps o ph) <sup>b</sup>	Bioaccesibilidad <sup>c</sup>	Referencia
<b>Pb</b>	<b>µg g<sup>-1</sup> ps</b>					
Moluscos comestibles	0,16-7 ph	ME	Saliva + GI	—	20-84	Amiard <i>et al.</i> , 2008
Polvo caco	0,15-0,2 ps	ME	GI + enzimática	—	24-41	Mounicou <i>et al.</i> , 2002
Licor de cacao	0,1-0,15 ps	ME	GI + enzimática	—	29-30	
Vinos	19-71 ph	ME	GI	—	36-95 16-75% dializable	Azenha y Vasconcelos, 2000
Vinos	19-71 ph	ME	GI	—	16-75% dializable	

**Tabla 5.** Continuación

Muestra	Concentración hallada (ps o ph) <sup>a</sup>	Método de digestión	Etapas	Valores bioaccesibles (ps o ph) <sup>b</sup>	Bioaccesibilidad <sup>c</sup>	Referencia
<b>Hg</b>	<b>ng g<sup>-1</sup> ps</b>					
Pez espada, atún, sardina crudos	0,072-0,43 ph	ME	GI	38-317 ph	9-17	Cabañero <i>et al.</i> , 2004
Caballa	1000 ph	ME	GI	—	70	Shim <i>et al.</i> , 2009

<sup>a</sup> Valores totales expresados como media ± SD

<sup>b</sup> Valores bioaccesibles de cada contaminante en cada matriz tras la aplicación de cada método de digestión

<sup>c</sup> Bioaccesibilidad =  $\frac{(\text{valor bioaccesible tras la aplicación del método de digestión}^b)}{(\text{concentración total en cada matriz}^a)} \times 100$

<sup>d</sup> ME: método estático de digestión *in vitro*

<sup>e</sup> GI: gastrointestinal

## Capítulo 2. Objetivos

Teniendo en cuenta:

- a) Los posibles efectos negativos para la salud de los elementos traza tóxicos arsénico y mercurio
- b) Las elevadas concentraciones de estos contaminantes que son susceptibles de presentar alimentos de alto consumo como el arroz en el caso del arsénico y del pescado en el caso del mercurio
- c) La escasez de estudios de riesgo toxicológico que consideren el cocinado y la bioaccesibilidad en estos productos

Se plantea como objetivo de esta tesis doctoral la contribución a un mejor conocimiento del efecto del cocinado y de la bioaccesibilidad en la evaluación del riesgo asociado a la ingesta de arsénico y mercurio a través del consumo de arroz y pescado, respectivamente.

Para el cumplimiento de este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterización de las concentraciones de arsénico total e inorgánico en arroces comercializados en España. Evaluación del efecto del cocinado del arroz con agua contaminada con arsénico. Evaluación del riesgo asociado a la presencia de arsénico en los arroces analizados.

- 2) Determinación de las concentraciones de arsénico total e inorgánico en arroces comercializados en Argentina y Bolivia. Especiación de arsénico en las fracciones bioaccesibles, obtenidas tras la aplicación de un método estático de digestión gastrointestinal *in vitro*. Influencia de la bioaccesibilidad sobre la evaluación del riesgo asociado a la presencia de arsénico en los arroces de estos países.
- 3) Estudio de las concentraciones de mercurio en pez espada crudo comercializado en España. Especiación de mercurio en la fracción bioaccesible. Evaluación de la seguridad alimentaria de este pescado.
- 4) Efecto del cocinado en la concentración de mercurio presente en peces depredadores comercializados en España (pez espada, cazón, bonito y atún) y en la bioaccesibilidad del contaminante. Influencia de la bioaccesibilidad en la evaluación del riesgo.
- 5) Comparación de un modelo estático y un modelo dinámico (TIM-1) de digestión gastrointestinal *in vitro* para la evaluación de la bioaccesibilidad de elementos traza tóxicos en materiales de referencia certificados de alimentos.

## Capítulo 3. Materiales

### 3.1. Muestras

Para llevar a cabo la investigación propuesta se utilizaron las muestras de arroces y de pescados que se describen a continuación.

#### 3.1.1. Arroz

Se analizaron muestras de arroz adquiridas en comercios de España (Valencia, n = 39), Argentina (Buenos Aires, n = 32) y Bolivia (Santa Cruz de la Sierra, n = 27).

Las muestras de *Oryza sativa* L., subespecies *indica* y *japonica*, incluyeron arroces de distintos tipos de grano (redondo, medio y largo) sometidos a distintos procesos industriales de elaboración (blanco, integral, dorado y sancochado). Se estudiaron además variedades de arroz de consumo menos frecuente como arroz Basmati, arroz Thai, arroz salvaje y arroz rojo, así como mezclas de distintos arroces y mezclas de arroz con otros vegetales.

La totalidad de las muestras se analizaron crudas, tras una trituración en un molinillo convencional. Algunos de los arroces fueron sometidos a un proceso de cocción con agua en el que no se utilizó sal, aceite ni otros ingredientes adicionales, y donde la proporción de arroz con respecto del agua fue de 1:4. La cocción se llevó a cabo hasta la evaporación total del agua. En el caso de las muestras de arroz comercializadas en Argentina y

Bolivia se utilizó para la cocción agua desionizada. Posteriormente las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Para la cocción de las muestras de arroz comercializadas en España, se utilizó agua desionizada adicionada con concentraciones de As(V) comprendidas entre 0,1 y 1 µg mL<sup>-1</sup>. Tras la cocción, estas muestras fueron liofilizadas, molidas y almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

### 3.1.2. Pescados

Se analizaron muestras de pez espada (*Xiphias gladius*, n = 34), cazón (*Galeorhinus galeus*, n = 7), bonito (*Sarda* sp., n = 7) y atún (*Thunnus* sp., n = 7), congeladas o frescas de acuerdo con su disponibilidad en el mercado. Las muestras fueron adquiridas en comercios de la ciudad de Valencia (n = 28) o proporcionadas por la empresa ANFACO-CECOPESCA (n = 27).

Parte de las muestras de pescado se analizaron únicamente en crudo. Para ello se eliminaron las partes no comestibles y se procedió a su liofilización, trituration y almacenamiento a 4 °C hasta su análisis. Otras muestras fueron analizadas en crudo y en cocinado, para lo cual se adquirieron rodajas de entre 150 g y 250 g que fueron divididas en dos porciones iguales. Una de las porciones se empleó para el análisis en crudo y la otra porción se cocinó. No se utilizó aceite ni otros ingredientes adicionales para el cocinado. Tanto la porción cruda como la cocinada se liofilizaron, trituraron y almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Información adicional sobre la adquisición y preparación de las muestras se detalla en los capítulos de resultados de la presente tesis.

### 3.2. Materiales de referencia

A lo largo de las investigaciones se utilizaron materiales de referencia de agua y alimentos con concentraciones certificadas para los elementos de interés.

#### *Productos de la pesca con concentraciones certificadas de As, Cd, Pb y Hg*

- *Fucus* sp. IAEA 140/TM. Proporcionado por International Atomic Energy Agency (IAEA), Analytical Quality Control Services (Vienna, Austria).
- TORT-2. Hepatopáncreas de langosta. Proporcionado por Institute for Environmental Chemistry, National Research Council of Canada (NRC) (Ottawa, Canadá).
- DORM-2. Músculo de pez perro. Proporcionado por Institute for Environmental Chemistry, National Research Council of Canada (NRC) (Ottawa, Canadá).

#### *Agua con concentraciones certificadas de As, Cd y Pb*

- Agua. *EnviroMAT* drinking water (EP-H-2). Proporcionada por SCP Science (Canadá).

#### *Arroz con concentraciones certificadas de As, Cd y Hg*

- SRM1568a. Rice flour. Proporcionado por National Institute of Standards and Technology, NIST (Gaithersburg, EE. UU.).

En la actualidad no se comercializan muestras de referencia certificadas para su concentración en arsénico inorgánico. El Laboratorio de Contaminación Metálica del IATA ha caracterizado la concentración de arsénico inorgánico en el material de referencia Rice flour (SRM1568a), utilizándose dicha muestra para llevar a cabo el control de calidad de la metodología.

### **3.3. Reactivos, patrones y disoluciones**

#### **3.3.1. Reactivos**

Todos los reactivos químicos empleados fueron de calidad para análisis o superior.

- Agua desionizada (Resistividad: 18,2 M $\Omega$  cm).
- Agua de irrigación (B. Braun Medical).
- Antiespumante B (Sigma).
- Argón (99,995%).
- Ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH), w = 99,7%, d = 1,051 g mL<sup>-1</sup> (Probus).
- Ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) (Merck).
- Ácido bromhídrico (HBr), w  $\geq$  48% (Merck).



- Ácido clorhídrico concentrado (HCl),  $w = 37\%$ ,  $d = 1,19 \text{ g mL}^{-1}$  (Merck).
- Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>),  $w = 85\%$ ,  $d = 1,69 \text{ g mL}^{-1}$  (Merck).
- Ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>),  $w = 65\%$ ,  $d = 1,39 \text{ g mL}^{-1}$  (Merck).
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),  $w = 95\text{-}98\%$ ,  $d = 1,84 \text{ g mL}^{-1}$  (Probus).
- Amoníaco (NH<sub>3</sub>),  $w = 20\%$ ,  $d = 0,917 \text{ g mL}^{-1}$  (Prolabo).
- Amonio dihidrógenofosfato [(NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>] (Merck).
- Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) (Acros y Panreac).
- Borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>) (Probus).
- Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>),  $w = 99\%$ ,  $d = 1,48 \text{ g mL}^{-1}$  (Merck).
- Cloruro de estaño (II) dihidratado (SnCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) (Scharlau).
- Cloruro de calcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) (Acros).
- Cloruro potásico (KCl) (Acros).
- Cloruro sódico (NaCl) (Acros).
- Extracto biliar porcino (glicina y taurinas conjugadas del ácido desoxicólico y otras sales biliares) (Sigma, B8631).
- Helio (99,9999%).
- Hidróxido sódico (NaOH) (Merck).
- L- cisteína [HOOCCH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>SH] (Merck).
- Lipasa (150 UI/mg) (Amano Pharmaceuticals, F-AP 15).
- Nitrato de magnesio hexahidratado [Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O] (Panreac).

- Nitrógeno líquido.
- Óxido de magnesio (MgO) (Panreac).
- Pancreatina porcina de actividad enzimática equivalente a 4x especificaciones de la Farmacopea de los EE. UU./mg pancreatina (Sigma, P1750 y MP Biomedicals, 193975).
- Pepsina porcina de actividad enzimática 944 UI/mg proteína (Sigma, P7000) y 2.410 UI/mg proteína (Sigma, P7012).
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), w = 30%, d = 1,11 g mL<sup>-1</sup> (Prolabo).
- Persulfato potásico ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) (Probus).
- Sulfato de hidracina [ $(\text{NH}_2)_2 \text{H}_2\text{SO}_4$ ] (Panreac).
- Tris-HCl (Merck).
- Tripsina (Sigma, T 4665).
- Yoduro potásico (KI) (Panreac).

### 3.3.2. Patrones

- Disolución patrón de As(III) de 1.000 µg mL<sup>-1</sup>. Preparar disolviendo 1,320 g de  $\text{As}_2\text{O}_3$  (Riede de Haën) en 25 mL de KOH al 20% (m/v) y neutralizar con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 20% (v/v). Diluir a 1 L con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1% (v/v).
- Disolución patrón de As(V) de 1.000 µg mL<sup>-1</sup> (Merck).

- Disolución patrón de ácido de metilarsonato sódico hexahidratado (MMA) (Carlo Erba). Concentración de  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , expresada como arsénico.
- Disolución patrón de dimetilarsinato sódico trihidratado (DMA) (Fluka). Concentración de  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , expresada como arsénico.
- Disolución patrón de Hg(II) de  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Merck).
- Disolución patrón de metilmercurio (MeHg). Preparar disolviendo la sal de cloruro de metilmercurio (Sigma-Aldrich) en metanol-agua al 50% (v/v). Concentración de  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , expresada como mercurio.
- Disolución patrón de Cd de  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Merck).
- Disolución patrón de Pb de  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Merck).

Las disoluciones patrón de trabajo se prepararon por diluciones sucesivas del patrón primario.

### 3.3.3. Disoluciones

#### 3.3.3.1. Disoluciones utilizadas para la cuantificación de arsénico y sus especies químicas

- Agente coadyuvante de la mineralización. Suspensión de  $[\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  al 20% (m/v) y MgO al 2% (m/v) en agua desionizada. Mantener en agitación hasta su adición a la muestra.
- Disolución de sulfato de hidracina al 1,5% (m/v) en agua desionizada.

- Disolución oxidante de persulfato potásico al 1,29 % (m/v) en NaOH al 2,5% (m/v).
- Disolución reductora. Mezcla de yoduro potásico al 5% (m/v) y ácido ascórbico 5% (m/v) en agua desionizada.
- Disolución de borohidruro sódico al 0,2% (m/v) en hidróxido sódico al 0,05% (m/v).
- Disolución de borohidruro sódico al 1,5 % (m/v) en hidróxido sódico al 0,7% (m/v).
- Disolución de borohidruro sódico al 4% (m/v) en hidróxido sódico al 0,8% (m/v).
- Disolución de Tris-HCl  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  en agua desionizada.
- Tampón ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ )  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  y  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 5,75.

### **3.3.3.2. Disoluciones utilizadas para la cuantificación de mercurio y metilmercurio**

- Disolución oxidante de persulfato potásico al 1% (m/v) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .
- Disolución reductora de cloruro de estaño al 2% (m/v) en HCl al 15% (v/v).
- L-cisteína  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  en ácido acético  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

### **3.3.3.3. Disoluciones utilizadas para la cuantificación de cadmio y plomo**

- Modificador de matriz. Disolución de 6,70 mg de amonio dihidrógenofosfato y 0,3 mg de nitrato de magnesio en 1 mL de ácido nítrico al 1% (v/v).

### **3.3.3.4. Disoluciones utilizadas para la digestión gastrointestinal *in vitro***

#### *3.3.3.4.1. Digestión gastrointestinal in vitro estática*

- Disolución de pepsina porcina al 10% (m/v) en HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.
- Disolución de pancreatina porcina al 0,4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2,5% (m/v) en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Todas las disoluciones empleadas en el método de digestión gastrointestinal *in vitro* estático fueron preparadas con agua de irrigación.

#### *3.3.3.4.2. Digestión gastrointestinal in vitro dinámica TIM-1*

- Disolución salina utilizada en la etapa de digestión estomacal. Preparar en agua desionizada a partir de cloruro de sodio al 0,3% (m/v), cloruro de potasio al 0,11% (m/v), cloruro de calcio dihidratado al 0,015% (m/v) y bicarbonato de sodio al 0,06% (m/v).

- Disolución de lipasa al 0,17% (m/v) en la disolución salina estomacal anteriormente mencionada.
- Disolución de pepsina al 0,09% (m/v) en la disolución salina estomacal anteriormente mencionada.
- Disolución de tripsina al 0,02% (m/v) en la disolución salina estomacal anteriormente mencionada diluida al 10% (v/v).
- Disolución de pancreatina porcina al 10% (v/v) en agua desionizada.
- Disolución de extracto biliar al 4% (m/v) en agua desionizada.
- Disolución salina utilizada en la etapa de digestión en el intestino delgado. Preparar a partir de cloruro de sodio al 0,5% (m/v), cloruro de potasio al 0,06% (m/v) y cloruro de calcio dihidratado al 0,023% (m/v).

Todas las disoluciones empleadas en el método de digestión gastrointestinal *in vitro* dinámico (TIM-1) fueron preparadas con agua desionizada.

Acondicionamiento del material: Todo el material de vidrio y polietileno nuevo se sumergió en  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) durante una semana antes de usarlo por primera vez. Tras el uso del material en el método analítico, éste se enjuagó con agua, se sumergió en  $\text{HNO}_3$  al 10% (v/v) durante 24 horas, se enjuagó tres veces con agua desionizada y se secó.

### 3.4. Equipo instrumental

- Agitador magnético. Jenway 1000 calefactor.
- Agitador mecánico. IKA Labortechnik, modelo KS 130 Basic.
- Balanza analítica. Ohaus, modelo Voyager.
- Balanza granatario. Cobos, modelo Precision CB.
- Baño de arena termostatado. Raypa, modelo PL 5125.
- Centrífuga. Eppendorf, modelo 5810.
- Centrífuga. Heraeus, modelo Biofuge Pico.
- Centrífuga. Sorvall Pont, modelo Superspeed, RC-5B Instrument.
- Equipo de agua Milli-Q. Millipore Inc., modelo Milli-Q water system.
- Horno mufla. Heraeus, modelo K1253 con programador.
- Liofilizadores. FTS Systems (modelo Tri-philizer MP) y Virtis (modelo Genesis SQ 35 EL).
- Microondas. CEN, modelo MARS 800 W. Equipado con reactores de teflón PFA con un volumen de 55 mL.
- pHmetro. Hanna, WTW modelo 526.
- Baño de ultrasonidos. Selecta, modelo Ultrasons 1/3.
- Baño calefactor. Julabo, modelo HC 5/9.
- Baño de agua orbital. Selecta, modelo Unitronic Orbital.
- Lámparas de arsénico, cadmio, plomo y mercurio.

- Espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo 3300) acoplado a un sistema de inyección en flujo (Perkin Elmer, modelo FIAS-400) y a un muestreador automático (Perkin Elmer, modelo AS-90).
- Espectrofotómetro de absorción atómica con cámara de grafito (Perkin Elmer, modelo AAnalyst 600), acoplado a un muestreador automático (Perkin Elmer, modelo AS-800).
- Espectrofotómetro de fluorescencia atómica (PSA, modelo Merlin 10.025).
- Sistema de cromatografía líquida de alta resolución (Hewlett Packard, modelo 1050). Incluye los siguientes módulos: bomba cuaternaria con doble pistón, sistema de desgasificación en línea, inyector automático y horno para columnas.
- Convertidor analógico-digital (Hewlett-Packard, modelo 35900). Permite convertir la señal analógica procedente del espectrofotómetro de fluorescencia atómica, en una señal digital que es enviada al software cromatográfico para su posterior tratamiento.
- TIM-1 (TNO, Zeist, The Netherlands). Modelo dinámico de digestión gastrointestinal *in vitro*. El modelo consiste en distintas unidades de vidrio con paredes internas flexibles. Estas unidades de vidrio se distribuyen formando cuatro compartimentos diferenciados que simulan el estómago, el duodeno, el yeyuno y el íleo.



## Capítulo 4. Métodos

### 4.1. Determinación de arsénico total

Las muestras se mineralizaron por vía seca y el arsénico se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros mediante inyección en flujo (FI-HG-AAS) (Muñoz *et al.*, 2002)

La cantidad de muestra sobre la que se aplicó el método fue diferente en función de la matriz objeto de estudio:

- Materiales de referencia de alimentos: 0,2 g
- Arroces crudos: 0,25 g
- Arroces cocinados y posteriormente liofilizados: 0,25 g
- Arroces cocinados y no liofilizados: 1 g
- Fracciones bioaccesibles liofilizadas de materiales de referencia: 0,2 g
- Fracciones bioaccesibles de arroces cocinados: 5 g

Se adicionaron a la muestra 2,5 mL de agente de mineralización [ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  20% m/v + MgO 2% m/v] y 5 mL de  $\text{HNO}_3$  (50% v/v). La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena y posteriormente se mineralizó en un horno mufla, aplicando un ciclo temperatura-tiempo en el que tras una subida paulatina de la temperatura (50 °C/h), las muestras se mantuvieron 12 h a 450 °C.

Si tras el ciclo de mufla se obtuvieron cenizas blancas se procedió a su disolución. En caso contrario, las cenizas se trataron con 5 mL de  $\text{HNO}_3$

(50% v/v), se secaron en un baño de arena y fueron sometidas nuevamente al programa temperatura-tiempo indicado anteriormente.

Las cenizas blancas obtenidas tras la mineralización se disolvieron en HCl 6 mol L<sup>-1</sup> y en una disolución reductora (KI 5% m/v y ácido ascórbico 5% m/v). Transcurridos 30 minutos, la disolución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y tras la adición de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> se llevó a un volumen final de 10 ó 25 mL en función de la muestra analizada. La proporción de reductor adicionado con respecto al volumen final de disolución fue de 1:5.

La cuantificación del arsénico total mediante FI-HG-AAS se llevó a cabo empleando las condiciones instrumentales descritas en la tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de As mediante FI-HG-AAS

Generación de hidruros	
Muestra	0,5 mL
Disolución reductora	NaBH <sub>4</sub> 0,2% (m/v) en NaOH 0,05% (m/v). Flujo 5 mL min <sup>-1</sup>
Disolución ácida	HCl 10% (v/v). Flujo 10 mL min <sup>-1</sup>
Gas transportador	Argón. Flujo 100 mL min <sup>-1</sup>
Espectroscopía de absorción atómica	
T <sup>a</sup> de atomización	900 °C
Longitud de onda	193,7 nm
Rendija	0,7 nm
Lámpara de As	Lámpara de descarga sin electrodos; 400 mA

Las características analíticas del método para las muestras de alimentos fueron las siguientes: límite de detección =  $0,026 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco (ps); precisión = 2%. Para las fracciones bioaccesibles, el límite de detección instrumental fue de  $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ .

El control del adecuado funcionamiento de la cuantificación mediante FI-HG-AAS se realizó a través del análisis de la muestra de agua *EnviroMAT* drinking water (EP-H-2) con valores certificados para As de  $0,155\text{-}0,164 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El control de calidad del análisis realizado en las muestras mineralizadas y disueltas, se realizó con distintos materiales de referencia de alimentos con las siguientes concentraciones certificadas para As: *Fucus* sp. =  $42,2\text{-}46,4 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; Rice SRM1568a =  $0,29 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; DORM-2 =  $18,0 \pm 1,1 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; TORT-2 =  $21,6 \pm 1,8 \mu\text{g g}^{-1}$  ps.

## 4.2. Determinación de arsénico inorgánico mediante extracción selectiva con cloroformo

Las muestras se sometieron a una digestión ácida, extracción del arsénico inorgánico con solventes orgánicos, retroextracción en medio ácido y cuantificación mediante FI-HG-AAS (Muñoz *et al.*, 1999).

Digestión ácida. Se pesó  $1,0 \text{ g}$  de muestra en un tubo de centrifuga de plástico de  $50 \text{ mL}$ . Posteriormente se adicionaron  $4,1 \text{ mL}$  de agua desionizada y la mezcla se agitó mecánicamente durante 10 minutos hasta la completa humectación de la muestra. Finalmente se adicionaron  $18,4 \text{ mL}$  de  $\text{HCl } 12 \text{ mol L}^{-1}$  y tras agitar se dejó en reposo durante toda la noche (12-15 h).

Extracción con cloroformo. Se adicionaron a la digestión ácida, 1 mL de una disolución de sulfato de hidracina (1,5% m/v) y 2 mL de HBr concentrado, agitándose mecánicamente la mezcla durante 1 min. A continuación se adicionaron 10 mL de cloroformo, se agitó la mezcla mecánicamente durante 5 minutos y se centrifugó (2.000 rpm/5 min). La fase clorofórmica se recuperó por aspiración y se depositó en un nuevo tubo de plástico de 50 mL. El proceso de extracción con cloroformo se repitió dos veces más. Al final de esta etapa del proceso, se recuperó un volumen de fase clorofórmica de aproximadamente 30 mL.

La fase clorofórmica se filtró a través de filtros de politetrafluoroetileno con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y diámetro de 25 mm (Whatman GD/X) que retienen tanto materia orgánica como restos de fase ácida.

Extracción ácida. El arsénico inorgánico presente en la fase clorofórmica se extrajo empleando HCl 1,2 mol L<sup>-1</sup>. Se adicionaron 10 mL de HCl 1,2 mol L<sup>-1</sup> y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Las fases se separaron por centrifugación (2.000 rpm/5 minutos). La fase ácida se recuperó por aspiración y se depositó en un vaso de precipitados. El proceso de extracción se repitió una vez más. Al final de esta etapa del proceso, se recuperó un volumen de fase ácida de aproximadamente 20 mL.

Mineralización y cuantificación. Se adicionaron 2,5 mL de agente de mineralización [ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  20% m/v + MgO 2% m/v] y 10 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado a la fase ácida. La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena. Posteriormente, se aplicó el proceso de mineralización en horno mufla, disolución de las cenizas blancas y cuantificación mediante FI-HG-AAS descrito para la determinación de arsénico total (apartado 4.1).

Las características analíticas del método en los alimentos fueron las siguientes: límite de detección =  $0,014 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; precisión = 4%; recuperación As(III) = 99% y As(V) = 96%. Para las fracciones bioaccesibles, el límite de detección instrumental fue de  $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Debido a la inexistencia de muestras certificadas para arsénico inorgánico, el control de la metodología se realizó comparando los valores de arsénico inorgánico hallados en el MRC Rice flour SRM1568a, con el intervalo de concentraciones de arsénico inorgánico hallado previamente en esta muestra tanto por el Laboratorio de Contaminación Metálica del IATA como por otros grupos de investigación ( $0,08$ - $0,110 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) (Heitkemper *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2002; D'Amato *et al.* 2004; Williams *et al.*, 2005, Sanz *et al.*, 2005; Laparra *et al.*, 2005).

### 4.3. Cuantificación de especies arsenicales por HPLC-termooxidación-HG-AFS

La cuantificación de las especies arsenicales presentes en la fracción bioaccesible de los arroces crudos se realizó mediante HPLC acoplado a termooxidación-HG-AFS (Súñer *et al.*, 2001).

La fracción bioaccesible se filtró (Whatman  $0,22 \mu\text{m}$ ) y se inyectó en una columna cromatográfica PRP-X100. Tras la elución con la fase móvil, el eluato de la columna se termooxidó en línea al mezclarse con una disolución de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  y discurrir por un bucle de reacción de teflón situado en un baño calefactor a  $150^\circ\text{C}$ . Posteriormente, el eluato termooxidado se enfrió en un baño de hielo y se procedió a la generación de hidruros mediante la mezcla con HCl y borohidruro de sodio. Las arsinas generadas fueron conducidas al

detector de AFS utilizando argón como gas transportador. Las condiciones experimentales utilizadas se muestran en la tabla 7. La integración de las señales se realizó en área de pico y la cuantificación se realizó empleando el método de adición.

El control del adecuado funcionamiento de la cuantificación de las especies arsenicales se realizó mediante la cuantificación de una muestra acuosa adicionada de las especies de interés.

**Tabla 7.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de especies arsenicales mediante HPLC-termooxidación-HG-AFS

<b>HPLC</b>	
Columna	Intercambio aniónico Hamilton PRP-X100 (base polimérica; 10 $\mu\text{m}$ ; 250 mm x 4,1 mm d. i.)
Precolumna	Hamilton PRP- X100 (12-20 $\mu\text{m}$ ; 25 mm x 2,3 mm d. i.)
Fase móvil	Tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ ), pH 5,75 Solución A: 20 mM; Solución B: 100 mM Gradiente: 0-2 min: 100% A 2,1-3 min: 50% A y 50% B 3,1-7 min: 100% A
Volumen de inyección	100 $\mu\text{L}$
Flujo	1 $\text{mL min}^{-1}$
<b>Termooxidación</b>	
Oxidante	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 1,29% (m/v) en NaOH al 2,5% (v/v) Flujo 1 $\text{mL min}^{-1}$
Bucle de reacción	3 m x 0,3 mm d. i.
Tª del baño	150 $^\circ\text{C}$
<b>CV-AFS</b>	
Disolución reductora	$\text{NaBH}_4$ al 1,5% (m/v) en NaOH al 0,7% (m/v)
Disolución de HCl	1,5 $\text{mol L}^{-1}$ . Flujo 6 $\text{mL min}^{-1}$
Gas transportador	Argón. Flujo 300 $\text{mL min}^{-1}$
Gas de secado	Aire. Flujo 2,5 $\text{L min}^{-1}$
Hidrógeno	Flujo 60 $\text{mL min}^{-1}$
Longitud de onda	193,7 nm
Corriente primaria	27,5 mA
Corriente auxiliar	35,0 mA

#### 4.4. Cuantificación de especies arsenicales mediante trampa criogénica-HG-AAS

Las especies arsenicales inorgánicas [As(III), As(V)], monometiladas [MMA(V)] y dimetiladas [DMA(V)] presentes en la fracción bioaccesible de los arroces cocinados, fueron cuantificadas mediante espectrofotometría de absorción atómica acoplada a la generación selectiva de hidruros mediante trampa criogénica (Devesa *et al.*, 2004).

La generación de arsinas se realizó a pH 1 y 6. A pH 1 se generan las arsinas de las especies arsenicales trivalentes y pentavalentes mientras que a pH 6 se generan únicamente las arsinas de especies trivalentes. Para el ensayo a pH 1, en el frasco de reacción se mezcló la muestra, en un volumen variable en función de la concentración de arsénico existente en la misma, con 1 mL de antiespumante B al 1% (v/v) y 1 mL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>. El volumen restante hasta alcanzar 15 mL se completó con agua desionizada. Para el ensayo a pH 6, el HCl 6 mol L<sup>-1</sup> fue sustituido por 1 mL de Tris-HCl 2,5 mol L<sup>-1</sup>.

El frasco de reacción se conectó al separador gas-líquido y se inyectó 1 mL de NaBH<sub>4</sub> al 4% (m/v) en NaOH 0,02 mol L<sup>-1</sup>. Tras la adición de NaBH<sub>4</sub>, el canal de reacción se purgó con 200 mL min<sup>-1</sup> de He durante 2 minutos.

Las arsinas generadas en el frasco de reacción y transportadas por la corriente de He, fueron retenidas en una resina Chromosorb WAW-dimetildiclorosilano 46/60 colocada en un tubo de vidrio en forma de U sumergido en N<sub>2</sub> líquido. Transcurridos 2 minutos, la resina se retiró del N<sub>2</sub> líquido y se calentó mediante una resistencia de 1,6 Ω/ft colocada alrededor



del tubo. El calentamiento permite la separación de las arsinas según su punto de ebullición (-55 °C para la arsina; 2 °C para la metilarsina; 35,6 °C para la dimetilarsina). Las arsinas fueron transportadas hasta la celda de cuarzo del AAS procediéndose a la cuantificación de las especies arsenicales según las condiciones instrumentales que se muestran en la tabla 8. La integración de las señales se realizó en área de pico y la cuantificación se realizó frente a las curvas de calibrado de patrones para As inorgánico, As(III) y MMA. Para la cuantificación de DMA se utilizó el método de adición.

El control del adecuado funcionamiento de la cuantificación a pH 1 se realizó a través del análisis de la muestra de agua *EnviroMAT* drinking water (EP-H-2), cuya concentración en As está certificada (0,155-0,164  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Debido a la inexistencia de materiales de referencia certificados para As(III), MMA(V) y DMA(V), el control del adecuado funcionamiento de la cuantificación de estas especies se realizó mediante la cuantificación de una muestra acuosa adicionada de las especies de interés. Por lo que respecta a la cuantificación de las fracciones bioaccesibles de las muestras de arroz, se carece de materiales de referencia que puedan ser cuantificados en el sistema descrito.

**Tabla 8.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de especies arsenicales mediante trampa criogénica-HG-AAS

Generación de hidruros	
Muestra	Volumen variable en función de la muestra
Diluyente	pH = 1 $\Rightarrow$ 1 mL HCl 6 mol L <sup>-1</sup> pH = 6 $\Rightarrow$ 1 mL Tris-HCl 2,5 mol L <sup>-1</sup>
Antiespumante	1 mL antiespumante B 1% (v/v)
Reductor	1 mL de NaBH <sub>4</sub> 4% (m/v) en NaOH 0,8% (m/v)
Gas transportador	He. Flujo 200 mL min <sup>-1</sup>
Aire	140 mL min <sup>-1</sup>
Hidrógeno	600 mL min <sup>-1</sup>
Espectroscopía de absorción atómica	
Longitud de onda	193,7 nm
Rendija	0,7 nm
Lámpara de As	Lámpara de descarga sin electrodos; 400 mA

#### 4.5. Determinación de mercurio total

Las muestras se digirieron en un horno microondas y el mercurio se cuantificó por generación de vapor en frío acoplada a espectrometría de fluorescencia atómica (CV-AFS) (Súñer, 2005).

La cantidad de muestra sobre la que se aplicó el método fue diferente en función de la matriz objeto de estudio:

- Materiales de referencia de alimentos: 0,2 g
- Pescados crudos liofilizados: 0,2 g
- Pescados cocinados y posteriormente liofilizados: 0,2 g
- Fracciones bioaccesibles liofilizadas de materiales de referencia: 2 g
- Fracciones bioaccesibles liofilizadas de pescados crudos cocinados: 5 g

La muestra se colocó en un reactor de teflón. Posteriormente se adicionaron 4 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado y 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los reactores se irradiaron en el horno microondas a 800 W de potencia (180 °C/15 min). Tras el proceso de digestión, los digeridos se llevaron a vasos de precipitados y se dejaron reposar toda la noche con el fin de eliminar los vapores nitrosos. Posteriormente la disolución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y tras la adición de HCl 5% (v/v) se llevó a un volumen final de 10 ó 25 mL en función de la muestra analizada.

Para la cuantificación del mercurio total mediante CV-AFS se emplearon las condiciones instrumentales descritas en la tabla 9.

Las características analíticas del método para los alimentos fueron las siguientes: límite de detección =  $0,001 \mu\text{g g}^{-1}$  ph, equivalente a  $0,004 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; precisión = 8%; recuperación = 97%. Para las fracciones bioaccesibles fueron: límite de detección instrumental  $0,024 \text{ ng mL}^{-1}$ ; precisión = 10%; recuperación = 98%. En ambos casos el control de calidad del proceso de la digestión en microondas y posterior cuantificación se realizó con distintos materiales de referencia de pescados con las siguientes concentraciones certificadas para Hg: DORM-2 =  $4,64 \pm 0,26 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; TORT-2 =  $0,270 \pm 0,060 \mu\text{g g}^{-1}$  ps.

**Tabla 9.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Hg mediante CV-AFS

Disolución reductora	$\text{SnCl}_2$ 2% (m/v) en HCl al 15% (v/v). Flujo $4,5 \text{ mL min}^{-1}$
Blanco de reactivos	HCl al 5% (v/v). Flujo $9 \text{ mL min}^{-1}$
Gas transportador	Argón. Flujo $100 \text{ mL min}^{-1}$
Gas de secado	Argón. Flujo $0,3 \text{ L min}^{-1}$
Tiempo de demora	15 s
Tiempo de medida	40 s
Tiempo de retorno	60 s
Rango de amplificación	100
Filtro	32

#### 4.6. Cuantificación de metilmercurio

Las muestras se sometieron a una extracción ácida asistida con ultrasonidos, y el metilmercurio se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con termooxidación acoplada a CV-AFS (Súñer, 2005).

Se pesaron las fracciones bioaccesibles de los pescados (0,6 g) y se colocaron en un tubo de centrifuga de 50 mL de volumen. Posteriormente se adicionaron 8 mL de HCl al 20% (v/v) y la mezcla se llevó a baño de ultrasonidos durante 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 2.000 rpm durante 15 min, y se recogió el sobrenadante que se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm durante 10 min. El extracto resultante se filtró a través de una membrana de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Whatman).

Para la cuantificación del MeHg, se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra extraída en una columna cromatográfica Hamilton PRP-X100. Tras la elución isocrática con la fase móvil, el eluato de la columna se termooxidó en línea al mezclarse con una disolución de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  y discurrir por un bucle de reacción de teflón situado en un baño calefactor a 150  $^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el eluato termooxidado se enfrió en un baño de hielo y se mezcló con un flujo continuo de  $\text{SnCl}_2$ . Se generó así el  $\text{Hg}(0)$  que mediante un separador gas-líquido y un flujo continuo de argón, fue llevado al detector de AFS. Las condiciones instrumentales utilizadas se muestran en la tabla 10.

La identificación de las señales se realizó por coincidencia de los tiempos de retención entre la señal de la muestra y la del patrón. La cuantificación se realizó en área de pico frente a curvas de calibración externa. Las

características analíticas del método para las fracciones bioaccesibles de los pescados fueron: límite de detección instrumental =  $0,263 \text{ ng mL}^{-1}$ ; precisión = 5%; recuperación = 95%. El control de calidad del análisis se realizó con distintos materiales de referencia de pescados con concentraciones certificadas para MeHg: DORM-2 =  $4,47 \pm 0,32 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  ps; TORT-2 =  $0,270 \pm 0,060 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  ps.

**Tabla 10.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de MeHg mediante HPLC-termooxidación-CV-AFS

HPLC	
Columna	Intercambio aniónico Hamilton PRPX-100 (base polimérica; $10 \text{ } \mu\text{m}$ ; $250 \text{ mm} \times 4,1 \text{ mm d. i.}$ )
Precolumna	Hamilton PRP X-100 ( $12\text{-}20 \text{ } \mu\text{m}$ ; $25 \text{ mm} \times 2,3 \text{ mm d. i.}$ )
Fase móvil	L-cisteína $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ en ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
Volumen de inyección	$100 \text{ } \mu\text{L}$
Flujo	$1 \text{ mL min}^{-1}$
Termooxidación	
Oxidante	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1% (m/v) en $\text{H}_2\text{SO}_4$ al $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ Flujo $2 \text{ mL min}^{-1}$
Bucle de reacción	$3 \text{ m} \times 0,5 \text{ mm d. i.}$
Tª del baño	$150 \text{ }^\circ\text{C}$
CV-AFS	
Disolución reductora	$\text{SnCl}_2$ 2% (m/v) en HCl al 15% (v/v). Flujo $2 \text{ mL min}^{-1}$
Gas transportador	Argón. Flujo $100 \text{ mL min}^{-1}$
Gas de secado	Argón. Flujo $0,3 \text{ L min}^{-1}$
Rango de amplificación	100
Filtro	32

#### 4.7. Determinación de cadmio y plomo

Las muestras se digirieron en un horno microondas y los analitos cadmio y plomo fueron cuantificados mediante espectrofotometría de absorción atómica en cámara de grafito (GF-AAS) (Almela *et al.*, 2002).

Las muestras se pesaron en los reactores de teflón [0,2 g de materiales de referencia certificados; 4 g de fracciones bioaccesibles]. Posteriormente se adicionaron 4 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los reactores se irradiaron en el horno microondas a 800 W de potencia (180 °C/15 min). Tras el proceso de digestión, los digeridos se llevaron a vasos de precipitados y se dejaron reposar toda la noche con el fin de eliminar los vapores nitrosos. Posteriormente la disolución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua desionizada para su posterior cuantificación mediante GF-AAS. Las condiciones instrumentales empleadas se detallan en la tabla 11.

Las características analíticas del método para Cd y Pb en alimentos fueron, respectivamente: límite de detección = 0,003 y 0,05 µg g<sup>-1</sup> ps; precisión = 4 y 3%. Para las fracciones bioaccesibles, el límite de detección instrumental fue de 0,012 ng mL<sup>-1</sup> para Cd y 0,20 ng mL<sup>-1</sup> para Pb.

El control del adecuado funcionamiento de la cuantificación mediante GF-AAS se realizó a través del análisis de la muestra de agua *EnviroMAT* drinking water (EP-H-2), con valores certificados para Cd y Pb de 0,076-0,082 y 0,25-0,27 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, frente a las curvas de calibrado externas de cada analito. El control de la calidad del análisis realizado en las muestras digeridas y diluidas se realizó con distintos materiales de

referencia de alimentos con las siguientes concentraciones certificadas para Cd y Pb: *Fucus* sp. = 0,500-0,574  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (Cd) y 1,91-2,47  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (Pb); TORT-2 = 26,7  $\pm$  0,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (Cd) y 0,35  $\pm$  0,13  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (Pb).

**Tabla 11.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Cd y Pb mediante GF-AAS

Longitud de onda	Cd = 228,8 nm; Pb = 283,3 nm			
Rendija	0,7 nm			
Corrección de fondo	Zeeman			
Tubos	Tubos de grafito pirolizados con plataforma de L’Vov			
Método de calibración	Método de adición estándar			
Volumen de muestra	10 µL			
Modificador de matriz	6,7 mg de H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NH <sub>4</sub> y 0,3 mg de Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> en 1 mL de HNO <sub>3</sub> al 1% (v/v)			
Programa de horno				
Etap	Temperatura (°C)	Tiempo incremento de Tª (s)	Tiempo permanencia (s)	Flujo de Ar (mL min <sup>-1</sup> )
Secado	110	1	30	250
Secado	130	15	30	250
Mineralización	700 (Cd)	10	30 (Cd)	250
	1000 (Pb)		20 (Pb)	
Atomización	1500 (Cd)	0	5	0
	1600 (Pb)			
Limpieza	2450	1	3	250



#### **4.8. Método estático de digestión gastrointestinal *in vitro* para la estimación de la bioaccesibilidad**

Se empleó un método estático que simula las etapas gástrica e intestinal del proceso de digestión humana (Laparra *et al.*, 2003).

*Etapas gástrica.* Se pesó en un erlenmeyer una cantidad de alga, arroz o pescado liofilizado equivalente a 10 g de muestra fresca. Se adicionaron 90 mL de agua de irrigación y la mezcla se homogeneizó mediante agitación mecánica. Se ajustó el pH a 2 con HCl 6 mol L<sup>-1</sup> y transcurridos 5 minutos, se reajustó el pH en caso necesario. Posteriormente se adicionó 0,001 g de pepsina por gramo de muestra fresca, utilizando para ello una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. La mezcla se completó hasta 100 g con agua de irrigación.

El erlenmeyer se cubrió con parafilm y se incubó en un baño de agua con agitación (120 órbitas min<sup>-1</sup>) a 37 °C durante 2 h para emular la fase gástrica de la digestión. Transcurrido este tiempo, la digestión se interrumpió sumergiendo el erlenmeyer en un baño de hielo durante 10 minutos.

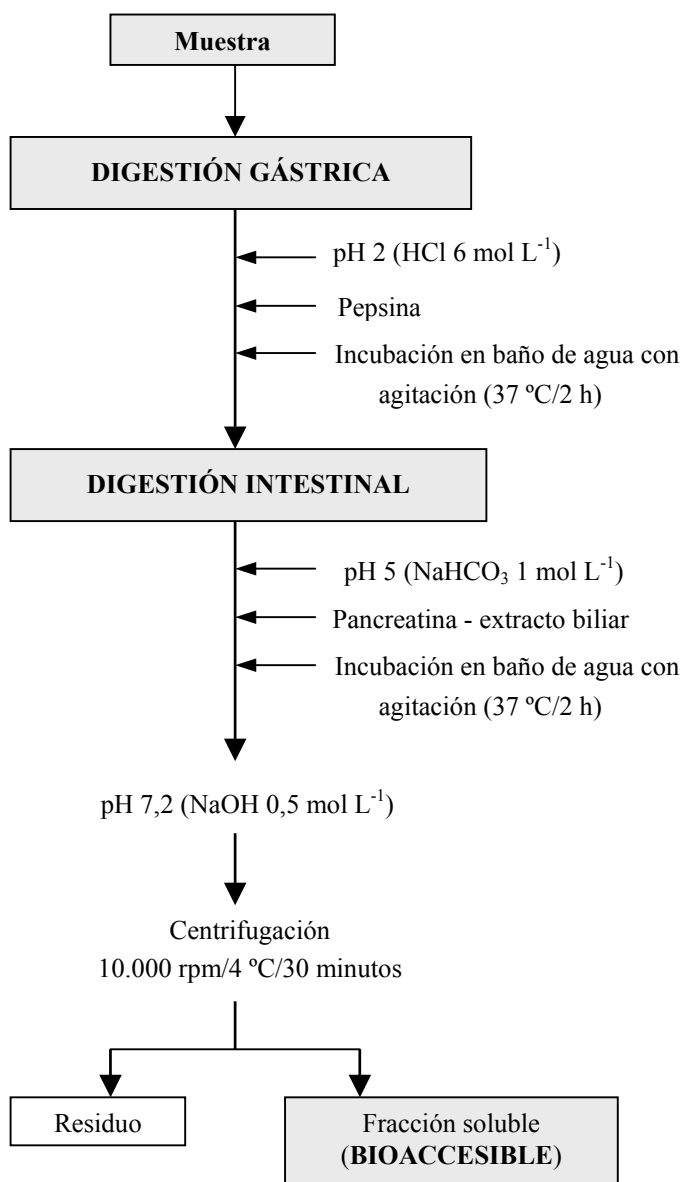
*Etapas intestinal.* Una vez finalizada la etapa gástrica, se ajustó el pH a 5 con NaHCO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>. Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0,4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2,5% (m/v) en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> y se adicionó la cantidad necesaria para proporcionar 2,5 x 10<sup>-4</sup> g de pancreatina y 1,5 x 10<sup>-3</sup> g de extracto biliar por gramo de muestra fresca.

El erlenmeyer se cubrió con parafilm y la mezcla se incubó nuevamente en agitación (120 órbitas min<sup>-1</sup>) durante 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el erlenmeyer se sumergió en un baño de hielo durante 10 minutos.

Una vez finalizada la etapa intestinal, se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente se transfirió el volumen del matraz a frascos de centrífuga con capacidad de 250 mL y se separó el sobrenadante por centrifugación (10.000 rpm/30 minutos/4 °C). En la fracción soluble obtenida tras la etapa intestinal, se cuantificó el contaminante de interés para cada una de las muestras objeto de estudio (arsénico, mercurio, cadmio, plomo, especies arsenicales o metilmercurio).

En la figura 1 se muestra un esquema del método estático de digestión gastrointestinal *in vitro*.

**Figura 1.** Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método estático de digestión gastrointestinal *in vitro*



#### 4.9. Método dinámico de digestión gastrointestinal *in vitro* para la estimación de la bioaccesibilidad (TIM-1)

Se empleó el modelo TIM-1 dinámico, multicompartimental y controlado por ordenador, para la simulación de la digestión humana en estómago e intestino delgado (Minekus *et al.*, 1995). El sistema se programó para reproducir la digestión humana de líquidos de acuerdo con los datos *in vivo*. Para el control del tránsito del alimento se utilizaron modelos matemáticos para los vaciados gástricos e ileales según la ecuación exponencial  $f = 1 - 2^{-(t / t_{1/2})^\beta}$ , donde  $f$  representa la fracción de alimento que se ha vaciado,  $t$  el tiempo de vaciado,  $t^{1/2}$  el tiempo de vida media de vaciado y  $\beta$  un coeficiente que describe la forma de la curva.

El tránsito del quimo se reguló por la apertura y cierre de las válvulas peristálticas que conectan los compartimentos. Mediante un ordenador se controló el volumen de cada compartimento, el pH y las bombas que permiten la introducción de las secreciones digestivas a cada compartimento. El sistema se mantuvo a 37 °C mediante un bombeo de agua entre el espacio existente entre la pieza de vidrio y la pared flexible. Los movimientos peristálticos se consiguieron cambiando la presión del agua.

Normalmente, el sistema lleva incorporadas unas unidades de membrana de fibra hueca que se hayan conectadas a los compartimentos ileal y yeyunal. Dichas membranas permiten absorber el agua y los distintos productos del quimo y modificar las concentraciones de electrolitos y sales biliares del mismo. Sin embargo, en la investigación realizada en esta tesis doctoral no se utilizaron estas membranas de diálisis puesto que sólo

interesaba estudiar la liberación de los metales en la parte luminal del tracto digestivo y determinar su bioaccesibilidad.

Se pesaron 5 g de los materiales de referencia de alimentos y se disolvieron en la cantidad de agua desionizada necesaria para proporcionar 300 mL de muestra, volumen que se introdujo en el compartimento estomacal. Para la etapa de digestión gástrica, se adicionaron disoluciones de lipasa al 0,17% (m/v) y de pepsina al 0,09% (m/v). El pH siguió una curva preestablecida por adición de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>: 6,4 / 5,7 / 4,5 / 2,9 / 2,3 y 1,7 a 0 / 15 / 45 / 90 / 120 y 300 min, respectivamente. El tiempo de vida media de vaciado gástrico fue de 85 min y el coeficiente  $\beta$  de la ecuación exponencial fue 1,8.

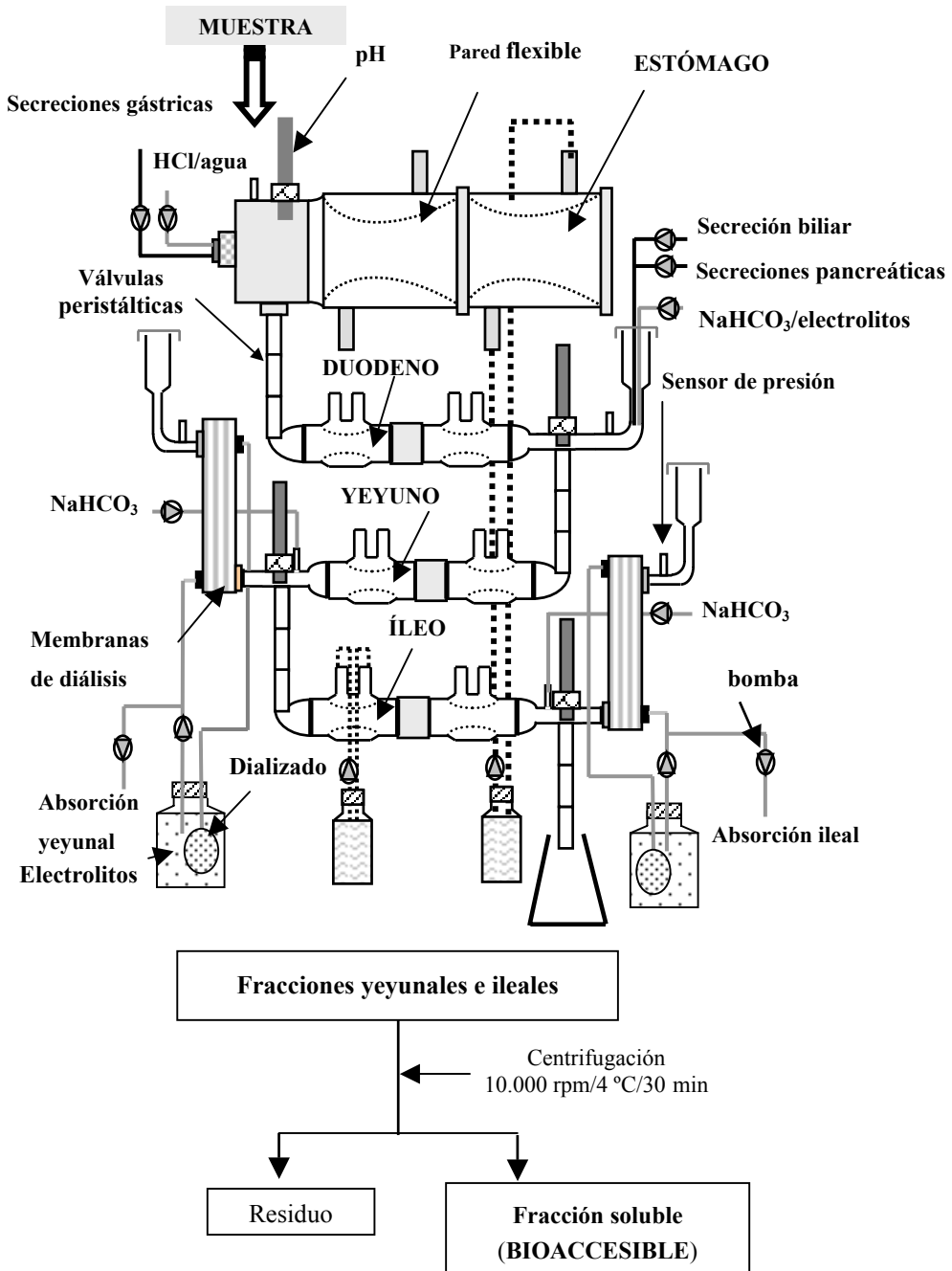
Para la etapa de digestión intestinal, se adicionó al compartimento duodenal una disolución de pancreatina al 10% (m/v) en el duodeno a un flujo de 0,25 mL min<sup>-1</sup> y una disolución de extracto biliar al 4% (m/v) a un flujo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Antes de iniciarse la digestión, el compartimento duodenal se llenó con 1 mL de la disolución de tripsina al 0,02% (m/v), 14 mL de extracto biliar, 7,5 mL de disolución de pancreatina y 7,5 mL de solución salina para el intestino delgado. Los compartimentos yeyunal e ileal se llenaron también con la disolución salina del intestino delgado. El tiempo de vida media del vaciado del intestino delgado fue de 250 min, y el coeficiente  $\beta$  fue 2,5. En el intestino delgado, el pH se mantuvo a 6,4 en el duodeno, a 6,9 en el yeyuno y a 7,2 en el íleo.

Una vez finalizado el proceso de digestión, se recogieron las fracciones ileales y yeyunales, así como el residuo final de la digestión. Las fracciones ileales y yeyunales fueron mezcladas y centrifugadas (10.000 rpm/30 min/4

°C) para separar la fracción soluble del precipitado. Las fracciones solubles se filtraron con papel Whatman No. 1, se liofilizaron y se disolvieron en agua para el posterior análisis de arsénico, cadmio, plomo y mercurio. En la fracción soluble de los residuos finales de la digestión también se analizaron los metales presentes.

En la figura 2 se muestra un esquema del método dinámico de digestión gastrointestinal TIM-1.

**Figura 2.** Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método dinámico de digestión gastrointestinal *in vitro* (TIM-1)



#### 4.10. Análisis estadístico

A lo largo de las investigaciones se han realizado diversos análisis estadísticos de los datos obtenidos.

Para establecer si existen diferencias significativas en las concentraciones de As total y As inorgánico entre las distintas zonas de producción de los arroces latinoamericanos, se realizó una ANOVA (Tukey HSD). Los análisis de regresión de las concentraciones de As inorgánico frente al As total se llevaron a cabo mediante el modelo de correlación de Pearson. Se consideró un nivel de significación del 5% ( $p < 0,05$ ). Los análisis estadísticos de estos datos se llevaron a cabo mediante el programa estadístico XLSTAT 2010.

Para explicar las diferencias en la respuesta tanto de las concentraciones de Hg en el pescado, como de las concentraciones de Hg bioaccesible en función del estado del producto (crudo y cocinado) y de las especies depredadoras de pescado (pez espada, cazón, bonito, atún) se aplicó un modelo mixto donde la muestra (individuo de cada especie) fue un factor aleatorio sobre el que se examinaban medidas repetidas (estado\*muestra). El modelo de análisis fue un test de efectos fijos tipo III factorial cruzado (estado, especie de pescado, especie de pescado\*estado). Se consideró un nivel de significación del 5% ( $p < 0,05$ ). Se realizó con el procedimiento MIXED de SAS/STAT 9.1.3. (SAS, 2008).

Para el análisis estadístico de los efectos del tipo de alimento (alga IAEA-140/TM y pescado TORT-2) y del método de digestión gastrointestinal (estático o TIM-1) sobre las concentraciones de As, Cd, Pb y Hg bioaccesibles, se aplicó el modelo de Ecuaciones de Estimación



Generalizadas (GEE) (Hardin y Hilbe, 2003; Dobson, 2002). El modelo factorial considerado incluyó tipo de alimento, método de digestión, tipo de alimento\*método de digestión, utilizando las determinaciones analíticas como factor de medidas repetidas. La distribución de probabilidad fue normal y la función de enlace, identidad. Se consideró un nivel de significación del 5% ( $p < 0,05$ ). Los análisis estadísticos de los datos obtenidos se llevaron a cabo mediante el procedimiento GENMOD en el programa estadístico SAS/STAT 9.1.3 (SAS, 2008).

## Capítulo 5. Resultados.

### 5.1. Arsénico total e inorgánico en arroces comercializados en España: efecto del cocinado y evaluación del riesgo toxicológico

*El arroz constituye el alimento básico de la dieta de una parte importante de la población mundial, principalmente en los países asiáticos en vías de desarrollo en los que puede contribuir hasta en un 70% al aporte diario de energía. El arroz, además de ser un alimento de gran interés nutricional, puede presentar concentraciones de arsénico superiores a las halladas en otros cereales y productos vegetales.*

*Si bien la producción mundial de arroz se halla concentrada en Asia, España constituye el segundo país productor de arroz de la Unión Europea, por detrás de Italia. A pesar de la alta producción de arroz en España y del alto consumo que se realiza en algunas regiones españolas, existen escasos datos sobre concentraciones de As en arroces comercializados en nuestro país.*

*El presente capítulo estudia las concentraciones de As total y As inorgánico en arroces comercializados y/o producidos en España, así como el riesgo asociado a su consumo. Adicionalmente evalúa el efecto del cocinado en las concentraciones del tóxico, emulando la situación de poblaciones de áreas contaminadas con arsénico. Los aspectos relativos a materiales y métodos correspondientes a este estudio se han descrito en los capítulos anteriores de la presente tesis. En las páginas siguientes se muestran los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.*

Las muestras de arroz analizadas en el presente capítulo se han adquirido en distintos comercios de Valencia ( $n = 39$ ), e incluyen las subespecies de arroz de mayor producción, *indica* y *japonica*, los tres tipos de grano (redondo, medio y largo), y diferentes procesos industriales de elaboración (blanco e integral). Asimismo, se analizan muestras de arroz Basmati (grano largo y fino aromático procedente de la India), arroz Thai (grano con aroma a jazmín), arroz salvaje (planta acuática de la especie *Zizania palustris*), y mezclas de arroz con otros vegetales (sésamo, lentejas rojas, lentejas verdes, azukis, soja verde) en las que el arroz representa como mínimo un 90% de la composición total de la mezcla.

La mayoría de los arroces analizados son cultivados en España ( $n = 25$ ), procediendo de León, Murcia, Sevilla, Tarragona, Valencia y de áreas de cultivo no especificadas. Las restantes muestras, corresponden a arroces importados de Italia ( $n = 5$ ), Francia ( $n = 1$ ), Canadá ( $n = 1$ ), EE. UU. ( $n = 2$ ), India ( $n = 2$ ) y Tailandia ( $n = 3$ ).

### 5.1.1. Arsénico total en arroz crudo

Las concentraciones de As total (tabla 12) oscilan entre  $0,058 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco (ps), en arroz Basmati de la India, y  $0,406 \mu\text{g g}^{-1}$  ps en arroz blanco cultivado en España. La concentración media (media  $\pm$  desviación estándar, SD) en arroces blancos ( $0,181 \pm 0,104 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 16$ ) está próxima a la hallada en los arroces integrales ( $0,199 \pm 0,056 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 18$ ), aunque el intervalo de concentraciones es más amplio en arroces blancos ( $0,058$ - $0,406 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) que en integrales ( $0,131$ - $0,302 \mu\text{g g}^{-1}$  ps). En la única muestra de

arroz salvaje analizada, la concentración de As total es inferior al límite de detección de la metodología ( $0,026 \mu\text{g g}^{-1}$  ps). Finalmente, las mezclas de distintos arroces, así como las de arroz con otros vegetales presentan una concentración media de As total ( $0,170 \pm 0,039 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 4$ ) similar a la descrita para el cereal.

**Tabla 12.** Concentraciones de arsénico total (As-t) y arsénico inorgánico (As-i) en arroces crudos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps), y porcentaje que el As-i representa sobre el As-t

Tipo arroz	Grano	País	Región (a)	As-t	As-i	(As-i/As-t)%
Blanco	Redondo	España	—	$0,406 \pm 0,007$	$0,133 \pm 0,004$	33
			—	$0,176 \pm 0,004$	$0,076 \pm 0,002$	43
			León	$0,133 \pm 0,001$	$0,089 \pm 0,001$	67
			Valencia	$0,136 \pm 0,009$	$0,080 \pm 0,001$	59
			Valencia	$0,141 \pm 0,010$	$0,093 \pm 0,004$	66
			Valencia	$0,144 \pm 0,019$	$0,066 \pm 0,001$	46
	Medio	España	—	$0,367 \pm 0,004$	$0,145 \pm 0,001$	40
	Largo	España	—	$0,350 \pm 0,016$	$0,095 \pm 0,003$	27
			Sevilla	$0,179 \pm 0,005$	$0,101 \pm 0,001$	56
			Tarragona	$0,190 \pm 0,005$	$0,101 \pm 0,002$	53
			Valencia	$0,098 \pm 0,010$	$0,062 \pm 0,002$	63
	Thai largo	Tailandia	—	$0,175 \pm 0,008$	$0,114 \pm 0,008$	65
			—	$0,141 \pm 0,002$	$0,087 \pm 0,002$	62
			—	$0,127 \pm 0,003$	$0,066 \pm 0,002$	52
	Basmati largo	India	—	$0,067 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,003$	45
			—	$0,058 \pm 0,008$	$0,027 \pm 0,002$	47
Integral	Redondo	España	—	$0,252 \pm 0,019$	$0,173 \pm 0,004$	69
			—	$0,302 \pm 0,024$	$0,204 \pm 0,018$	68
			Sevilla	$0,152 \pm 0,001$	$0,113 \pm 0,005$	74
		Italia	—	$0,269 \pm 0,005$	$0,144 \pm 0,001$	54
			—	$0,273 \pm 0,026$	$0,176 \pm 0,004$	64
	Medio	España	—	$0,145 \pm 0,005$	$0,114 \pm 0,008$	79
			—	$0,158 \pm 0,003$	$0,138 \pm 0,005$	87
			Murcia	$0,165 \pm 0,001$	$0,153 \pm 0,001$	93
			Murcia	$0,204 \pm 0,004$	$0,183 \pm 0,001$	90
			Tarragona	$0,288 \pm 0,013$	$0,253 \pm 0,006$	88

**Tabla 12.** Continuación

Tipo arroz	Grano	País	Región (a)	As-t	As-i	(As-i/As-t)%
Integral	Largo	España	—	0,230 ± 0,020	0,150 ± 0,003	65
			—	0,175 ± 0,009	0,128 ± 0,003	73
		Italia	—	0,179 ± 0,001	0,138 ± 0,001	77
			—	0,167 ± 0,012	0,116 ± 0,002	69
	Basmati largo	España	—	0,148 ± 0,004	0,081 ± 0,002	55
		EE. UU.	—	0,131 ± 0,009	0,087 ± 0,002	66
			—	0,191 ± 0,002	0,128 ± 0,001	67
	Rojo largo	Italia	—	0,146 ± 0,003	0,114 ± 0,008	78
Salvaje		Canadá	—	<LD	<LD	—
Mezcla		Francia	—	0,183 ± 0,010 (b)	0,113 ± 0,001 (b)	62
		España	—	0,171 ± 0,003 (c)	0,095 ± 0,004 (c)	56
			—	0,117 ± 0,011 (d)	0,070 ± 0,002 (d)	60
			—	0,209 ± 0,012 (e)	0,097 ± 0,005 (e)	46

\* Valores expresados como media ± SD (n = 3)

LD: límite de detección

(a) Cuando en la columna “Región” aparece el símbolo — indica que esta información no ha sido especificada en el envase del producto

(b) Mezcla de arroces: Basmati integral, rojo integral y silvestre

(c) Mezcla: arroz redondo, arroz salvaje, lentejas rojas y azukis

(d) Mezcla: arroz integral, arroz Basmati, sésamo, lentejas rojas, lentejas verdes, azukis y soja verde

(e) Mezcla de arroz salvaje (25%) y arroz sancochado de grano largo (75%)

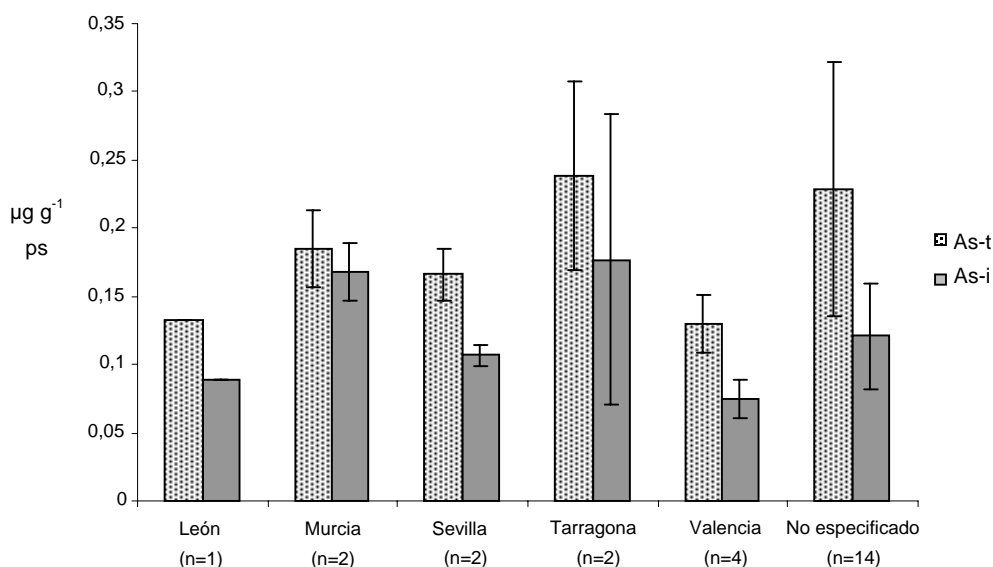
En la bibliografía se ha descrito que el proceso de pulido del arroz para la obtención de arroz blanco conlleva una disminución del As total (Phuong *et al.*, 1999). En el presente trabajo no se pone de manifiesto esta diferencia en los valores medios hallados en las muestras que el consumidor puede adquirir, aunque debe señalarse que los arroces blancos e integrales analizados no provienen del mismo grano. La única diferencia notable entre arroz blanco e integral aparece en el arroz Basmati, cuyas concentraciones en el arroz integral superan en 2,5 veces las halladas en el arroz blanco.

El tipo de grano de arroz (redondo, medio y largo), que se asocia a distintas variedades de cultivo, no da lugar a diferencias destacables en las concentraciones de As total. Así, las concentraciones (media  $\pm$  SD) en arroces blancos de grano redondo ( $0,189 \pm 0,107 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 6$ ) se solapan con las halladas en arroces blancos de grano largo ( $0,154 \pm 0,088 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 9$ ). Lo mismo ocurre con las concentraciones medias en los arroces integrales: grano redondo ( $0,250 \pm 0,057 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 5$ ), grano medio ( $0,192 \pm 0,058 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 5$ ) y grano largo ( $0,171 \pm 0,031 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 8$ ).

Un aspecto de interés es la concentración de As hallada en los arroces cultivados en España, cuyo valor medio es de  $0,201 \mu\text{g g}^{-1}$  ps ( $n = 25$ ). Las concentraciones en cada uno de los lugares de cultivo se muestran en la figura 3. Los arroces cultivados en Tarragona presentan la concentración más elevada (media =  $0,239 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 2$ ). En los arroces de Murcia (media =  $0,185 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 2$ ) y Sevilla (media =  $0,166 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 2$ ), las concentraciones son ligeramente inferiores. Las muestras procedentes de León ( $0,133 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 1$ ) y Valencia (media =  $0,133 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 4$ ) son

las de menor concentración de As total. El rango de concentración hallado en los arroces cultivados en España ( $0,098\text{--}0,406\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ps}$ ), engloba las concentraciones de As en arroces españoles descritas en la bibliografía ( $0,147\text{--}0,276\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ps}$ ;  $n = 8$ ) (Pizarro *et al.*, 2003; Delgado-Andrade *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005).

**Figura 3.** Concentraciones medias de As total (As-t) y As inorgánico (As-i) en arroces crudos según la región española de cultivo

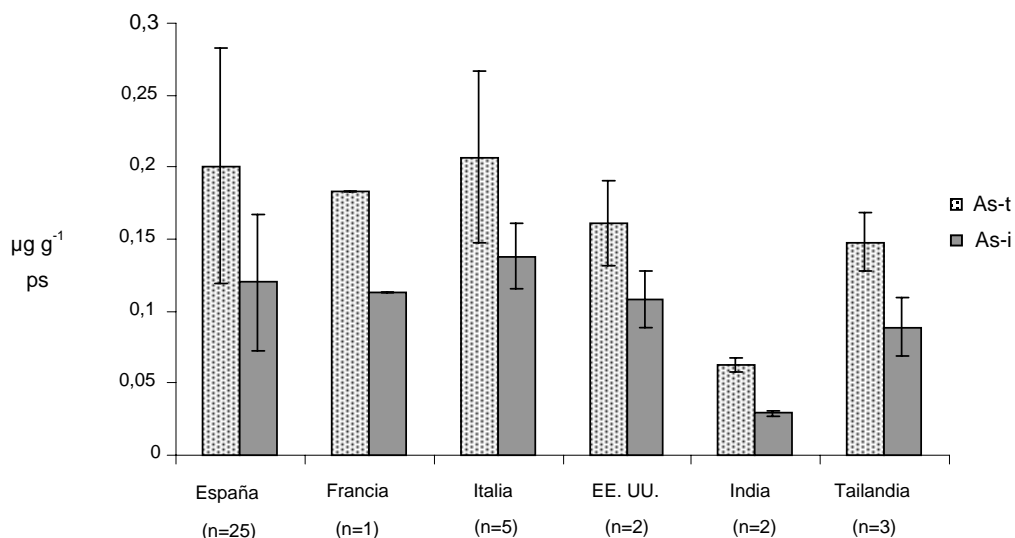




La figura 4 muestra las concentraciones medias de As total según el país de cultivo. Las muestras de origen europeo presentan una concentración media ( $0,197 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 31$ ) que está próxima al valor medio hallado en arroces europeos por Williams y colaboradores (2005) (media =  $0,18 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 7$ ). Los valores medios obtenidos para los arroces procedentes de Italia ( $0,207 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 5$ ) y EE. UU. ( $0,161 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 2$ ), se encuentran dentro del rango de concentraciones descritas en la bibliografía: Italia  $0,129$ - $0,275 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 13$ ; EE. UU.  $0,11$ - $0,66 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 152$  (Schoof *et al.*, 1999; Heitkemper *et al.*, 2001; D'Ilio; *et al.*, 2002; Pizarro *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2007).

El valor medio en arroces comercializados en la India ( $0,063 \mu\text{g g}^{-1}$  ps,  $n = 2$ ) es similar al descrito por otros autores ( $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 12$ ) (Sanz *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005). También es similar la concentración media hallada en arroz tailandés ( $0,148 \mu\text{g g}^{-1}$  ps,  $n = 3$ ) al único valor medio reportado para este país ( $0,11 \mu\text{g g}^{-1}$  ps,  $n = 1$ ) (Williams *et al.*, 2005). En la bibliografía también se indican concentraciones de As total en arroz crudo de otras procedencias: Vietnam  $0,249 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 56$  (Phuong *et al.*, 1999); Australia  $0,258 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 11$  (Phuong *et al.*, 1999); Canadá  $0,287 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 7$  (Dabeka *et al.*, 1993); Croacia ( $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 38$ ) y Japón ( $0,170 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 34$ ) (Hironaka y Ahmad, 2003).

**Figura 4.** Concentraciones medias de As total (As-t) y As inorgánico (As-i) en arroces crudos comercializados en España, según el país de origen



La gran producción de arroz en áreas asiáticas con problemas de contaminación con As, junto a las elevadas concentraciones de As total detectadas en algunas muestras de arroz, llevó al Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor de la FAO a alertar en el año 2006 sobre el posible riesgo de este cereal (Heikens, 2006). Dicho informe indica que  $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$  es una concentración de As total habitual en arroces comercializados en Europa y EE. UU., y utiliza dicho valor como concentración de referencia para evaluar el grado de contaminación de los arroces asiáticos. Sin embargo, este valor de referencia en arroces no

asiáticos es muy inferior al valor medio de As total hallado en los arroces analizados en este capítulo ( $0,188 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; tabla 12) y al valor normal en arroz crudo ( $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) propuesto por Meharg y Rahman (2003). Esta diferencia en las concentraciones indica la necesidad de continuar las investigaciones sobre As total en arroz con el objeto de obtener líneas bases acordes a la realidad de las distintas zonas de cultivo o de los distintos países productores y/o consumidores.

Si bien es cierto que algunos arroces de Bangladesh han presentado elevadas concentraciones de As total ( $1,23\text{-}2,05 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) (Meharg y Rhaman, 2003; Williams *et al.*, 2005), la mayor parte de las muestras adquiridas en comercios de Bangladesh ( $0,13 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 15$ ; Williams *et al.*, 2005) o proporcionadas por familias de Bangladesh que habitan áreas afectadas por arsenicismo crónico endémico ( $0,136 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 10$ , Das *et al.*, 2004) no muestran concentraciones de As total muy diferentes a las halladas en arroces europeos. En la India la situación es similar. Las muestras proporcionadas por familias hindúes afectadas por arsenicismo crónico también presentan concentraciones de As total dentro del intervalo descrito para muestras de Italia y EE. UU.: India Central  $0,274 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 10$  (Patel *et al.*, 2005); Bengala del Oeste  $0,233 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 44$  (Roychowdhury *et al.*, 2003). En consecuencia, los arroces de países de zonas afectadas por arsenicismo crónico endémico no deben ser considerados de forma general como de alta concentración en dicho contaminante. Una generalización en este sentido podría dar lugar a alertas alimentarias con el consiguiente perjuicio para las economías asiáticas, grandes exportadoras de este cereal.

Las investigaciones realizadas en arroces cultivados bajo condiciones de experimentación controladas han mostrado que la concentración de As en el arroz aumenta significativamente al incrementar la concentración de As(V) en el agua de riego, siguiendo la tendencia: raíz > cáscara > grano (Abedin *et al.*, 2002; Dasgupta *et al.*, 2004). Existe también una considerable influencia varietal en la absorción de As (Meharg, 2004; Williams *et al.*, 2005). Sobre ambos factores, agua de riego y variedad, se podría actuar para disminuir los niveles de As en el arroz. Se ha llevado a cabo la identificación de un gen tolerante a As en el cromosoma 6 del arroz, lo cual podría ser utilizado para diseñar estrategias encaminadas a disminuir la concentración del tóxico en el cereal producido en regiones contaminadas con As (Dasgupta *et al.*, 2004). Por otra parte, dado que la cuantificación de As total no permite una adecuada evaluación del riesgo, es necesario que los grupos de investigación y los organismos internacionales basen sus conclusiones en las concentraciones de As inorgánico.

### **5.1.2. Arsénico inorgánico en arroz crudo**

Uno de los principales problemas con los que se enfrenta un laboratorio analítico para la obtención de resultados fiables al analizar el As inorgánico en alimentos, es el desarrollo o la selección de un método que permita conseguir la extracción cuantitativa de As inorgánico evitando al mismo tiempo la extracción de otras especies arsenicales.

El método de digestión ácida, extracción con disolventes y cuantificación por FI-HG-AAS desarrollado por el laboratorio de Contaminación Metálica del IATA-CSIC, y empleado en este trabajo para la determinación de As

inorgánico (Muñoz *et al.*, 1999), cuantifica, además del As inorgánico, la totalidad del ácido monometilarsínico (MMA) existente en la muestra. Sin embargo, la sobreestimación producida por la cuantificación de MMA puede ser considerada insignificante debido a las bajas ( $0,002\text{--}0,02\ \mu\text{g g}^{-1}$  ps) o indetectables concentraciones de MMA halladas en arroz (Heitkemper *et al.*, 2001; Pizarro *et al.*, 2003; D'Amato *et al.*, 2004; Ackerman *et al.*, 2005; Sanz *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005). La concentración más elevada de MMA descrita en la bibliografía,  $0,06\ \mu\text{g g}^{-1}$  ps en arroz blanco de Taiwán (Williams *et al.*, 2005), sólo supondría una sobreestimación del 10% del As inorgánico de la muestra. En consecuencia, con el método analítico empleado en este trabajo la cuantificación conjunta de MMA y As inorgánico no afectaría de forma relevante a la evaluación del riesgo.

Las concentraciones de As inorgánico halladas en el presente estudio (tabla 12) oscilan entre  $0,027\ \mu\text{g g}^{-1}$  ps, en arroz Basmati indio, y  $0,253\ \mu\text{g g}^{-1}$  ps, en arroz integral español. La muestra de arroz salvaje es la única en la que no se detectó As inorgánico. Existen muy pocos datos en la bibliografía sobre As inorgánico en este cereal. Hasta el año 2003, se reducían a 15 muestras de arroz (Schoof *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 1999; Heitkemper *et al.*, 2001). Los estudios posteriores de Lamont, que analizó 40 arroces de EE. UU. (Lamont, 2003), y de Williams y colaboradores (2005), que analizaron 43 muestras de arroz de distintos orígenes, han supuesto una gran contribución al respecto. Los datos disponibles en la actualidad indican concentraciones de As inorgánico entre  $0,01\ \mu\text{g g}^{-1}$  ps y  $0,51\ \mu\text{g g}^{-1}$  ps (Schoof *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 1999; Heitkemper *et al.*, 2001; Pizarro *et al.*, 2003; D'Amato *et al.*, 2004; Laparra *et al.*, 2005; Sanz *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005).

El valor medio de As inorgánico (media  $\pm$  SD) en los arroces blancos analizados ( $0,085 \pm 0,032 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 16$ ) es inferior al hallado en los arroces integrales ( $0,144 \pm 0,042 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 18$ ), con una relación integral/blanco de 1,7. La investigación realizada por Williams y colaboradores (2005) pone de manifiesto una relación similar integral/blanco (1,8), aún cuando las concentraciones halladas por estos autores en ambos tipos de arroz [arroz blanco ( $0,05 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 7$ ) y arroz integral ( $0,09 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 17$ )] son inferiores a las del trabajo aquí presentado.

Dado que se trata de arroces de diferentes marcas comerciales y de distinta procedencia, no es posible conocer si el proceso industrial al que se somete el grano influye sobre la concentración de As inorgánico en el producto final. La mayor concentración de As inorgánico en el grano de los arroces integrales podría indicar que una parte del contaminante se encuentra unido a los componentes del salvado (Meharg *et al.*, 2008a).

Considerando las principales regiones españolas de cultivo del arroz (figura 3), se observa la siguiente gradación de concentraciones de As inorgánico: Tarragona ( $0,177 \mu\text{g g}^{-1}$  ps)  $\approx$  Murcia ( $0,168 \mu\text{g g}^{-1}$  ps)  $>$  Sevilla ( $0,107 \mu\text{g g}^{-1}$  ps)  $>$  Valencia ( $0,075 \mu\text{g g}^{-1}$  ps). Se evidencia una diferencia entre zonas de cultivo, aunque sería necesario analizar de un mayor número de muestras para corroborar esta tendencia. Incrementar los datos al respecto también permitiría establecer una línea base de As inorgánico en arroces españoles que pudiera ser de utilidad con vistas a conocer cuál sería la posición de la producción española ante una futura legislación europea sobre As inorgánico en arroz. Adicionalmente, deberían ser objeto de

investigación las posibles causas del origen del As inorgánico en estas zonas (suelos y/o aguas de riego contaminadas, variedad de cultivo, etc).

No existen datos previos sobre concentraciones de As inorgánico en arroces producidos en España, por lo que no pueden establecerse comparaciones. Respecto a los arroces cultivados en diferentes países y comercializados en España (figura 4), se observa que, al igual que ocurría para el As total, las concentraciones medias de As inorgánico más bajas se encuentran en los arroces procedentes de la India y Tailandia. En arroces italianos, los datos previos (media =  $0,098 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 5$ ) (Pizarro *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005) son muy similares a los hallados en este trabajo (media =  $0,138 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 5$ ). También los datos previos en arroz estadounidense (media =  $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 18$ ;  $0,118 \mu\text{g g}^{-1}$  ph;  $n = 39$ ) (Schoof *et al.*, 1999; Heitkemper *et al.*, 2001; Lamont, 2003; Williams *et al.*, 2005) están próximos a los presentados en la figura 4 (valor medio =  $0,108 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 2$ ). La coincidencia también es elevada en los arroces de la India [valores previos  $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 12$  (Sanz *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005); este trabajo  $0,029 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 2$ ] y Tailandia [valores previos  $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 1$  (Williams *et al.*, 2005), este trabajo  $0,089 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 3$ ]. Los mayores valores medios de As inorgánico descritos en la bibliografía corresponden a muestras de arroz de Taiwán [ $0,247 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 3$  (Schoof *et al.*, 1998)].

En las muestras analizadas en el presente estudio, los porcentajes que representa el As inorgánico frente al As total oscilan entre 27% y 93%. Porcentajes similares (11–91%) han sido reportados en la bibliografía, siendo el restante arsénico aportado por el ácido dimetilaránico (DMA)

(Schoof *et al.*, 1998; Heitkemper *et al.*, 2001; D'Amato *et al.*, 2004; Laparra *et al.*, 2005; Sanz *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005). Debido a la gran variación en el porcentaje de As inorgánico respecto al As total, no es adecuado realizar extrapolaciones en base a las concentraciones de As total con vistas a la evaluación del riesgo asociado a la presencia de As inorgánico en este cereal. Es pues necesaria la determinación analítica de As inorgánico.

Como han evidenciado los datos anteriores, salvo en muestras puntuales, las diferencias entre las concentraciones medias de As inorgánico en arroces crudos cultivados en los distintos países no son muy elevadas, por lo que es el consumo del grano (g/día) y no su concentración, el aspecto decisivo en la evaluación del riesgo para la población objeto de estudio. En dicha evaluación sería necesario considerar el proceso de cocinado aplicado al cereal, ya que éste podría modificar la concentración de As inorgánico.

Además de los problemas de seguridad alimentaria que pueden estar asociados al consumo del arroz, no debe olvidarse la existencia de legislaciones específicas para As total o inorgánico que podrían ocasionar problemas de comercialización. Actualmente, sólo China establece un límite de As inorgánico en arroz ( $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Heikens, 2006), valor que sería superado por un 18% de los arroces analizados en este trabajo.

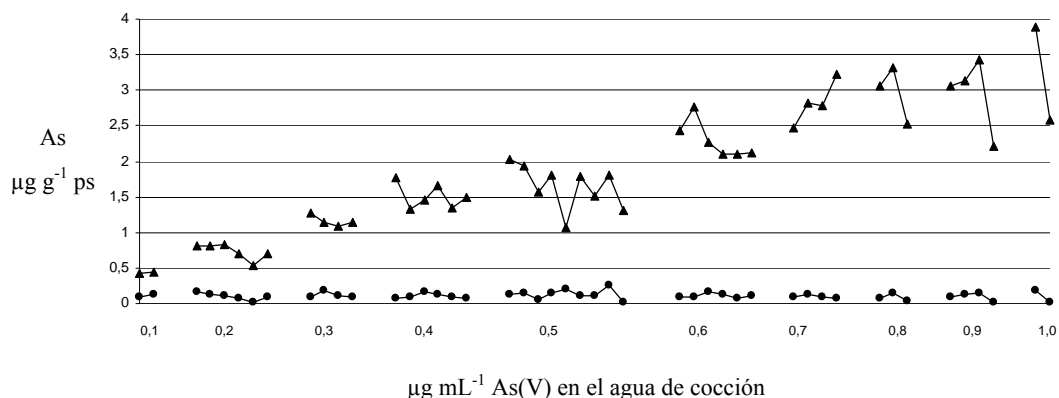


### 5.1.3. Arsénico inorgánico en arroz cocinado

En las muestras de arroz también se ha evaluado el efecto del cocinado con agua conteniendo arsénico, una realidad en zonas de Asia y América contaminadas por arsénico. La figura 5 muestra las concentraciones de As inorgánico halladas tras la cocción de diferentes tipos de arroz ( $n = 34$ ) en agua adicionada con concentraciones de As(V) entre 0,1 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Estas concentraciones de As en el agua utilizada para beber y cocinar se han descrito en áreas de Chile (Smith *et al.*, 1998), Argentina (Concha *et al.*, 1998), Méjico (Del Razo *et al.*, 2002), India y Bangladesh (Chakraborti *et al.*, 2002), siendo valores muy superiores al recomendado por la OMS [0,01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (WHO, 2004)]. Incluso se han descrito concentraciones muy superiores [4,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Bangladesh) y 3,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Bengala) (Chakraborti *et al.*, 2002)], si bien estos valores tan extremos no han sido considerados en el presente trabajo.

Los concentraciones de As inorgánico en arroces cocinados oscilan entre 0,428  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el agua de cocción) y 3,89  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el agua de cocción), representando como media el As inorgánico un 91% del As total, frente al 59% hallado en los arroces crudos. Tras el cocinado, queda retenido entre el 45% y el 107% del As existente en el agua de cocción. Esta elevada retención de As inorgánico en el grano cocinado con agua contaminada también ha sido descrita por otros autores (63% al 104%) (Ackerman *et al.*, 2005; Laparra *et al.*, 2005).

**Figura 5.** Concentraciones de As inorgánico en arroces crudos (●) y cocinados con agua adicionada de diferentes concentraciones de As(V) (▲)



\* Siete muestras de arroz fueron cocinadas con dos o tres concentraciones diferentes de As(V)

Con anterioridad, se ha señalado en la bibliografía que la capacidad de retención de agua es dependiente del tipo de arroz y de la forma de preparación (Ackerman *et al.*, 2005). En este trabajo, en el que se han cocinado arroces de distintos tipos (integral, blanco y con distinto tamaño de grano), la mayoría de los arroces retienen más del 74% del As(V) del agua de cocción, por lo que el tipo de arroz no parece influir sobre la capacidad de absorción de As inorgánico.

Si bien el empleo de agua con la menor cantidad posible de As es la mejor opción, no siempre es posible disponer de ella en las áreas endémicas en arsénico, pero podrían recomendarse procedimientos de cocinado que disminuyan la cantidad de As absorbida por el arroz. La influencia que los

diversos procesos de cocinado aplicados por los consumidores asiáticos pueden tener sobre la retención del arsénico del arroz ha sido estudiada por diversos autores (Sengupta *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2006). Si el arroz se cuece con un exceso de agua y ésta es descartada, la retención de As (43%) es inferior a la observada en preparaciones en las que el arroz es cocinado con una cantidad limitada de agua (72% y 99%) (Sengupta *et al.*, 2006). Por otra parte, el uso de arroz sancochado o no sancochado para el proceso del cocinado no conlleva grandes variaciones en la retención de As (Rahman *et al.*, 2006).

#### **5.1.4. Evaluación del riesgo toxicológico**

En España, el consumo de arroz crudo se cifra en 16 g/persona/día (AESAs, 2006). En los países asiáticos se producen consumos más elevados, alcanzando los 588 g/persona/día en el sudeste de Asia en 2005 (FAOSTAT, 2007). Los datos de consumo para arroz cocinado son más escasos y variables: 225 g/día en Taiwán (Schoof *et al.*, 1998), 750 g/día en Oeste de Bengala (India) (Roychowdhury *et al.*, 2003), y 1500 g/día en Bangladesh (Bae *et al.*, 2002). Dichos consumos para arroz crudo y cocinado han sido utilizados para evaluar la ingesta de As inorgánico a partir de los arroces analizados en el presente estudio (tablas 13 y 14). Con objeto de evaluar el riesgo para los consumidores, las ingestas obtenidas han sido comparadas con el valor de referencia toxicológico Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) propuesto por la FAO/WHO hasta el 2010: 15 µg As inorgánico/kg peso corporal/semana (WHO, 1989). Dicho valor equivale a una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 2,1 µg As inorgánico/kg

peso corporal/día. Considerando para los adultos un peso de 70 kg, la IDT alcanzaría los 150  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

En la tabla 13 se estima la ingesta de As inorgánico en base a las concentraciones de As inorgánico en arroz crudo halladas en este capítulo (tabla 12), y los datos de consumo de España y de países asiáticos. Para el consumo medio español (16 g/día), en ninguno de los supuestos (concentración mínima, media y máxima de As inorgánico) se alcanza la IDT. Si se considera el consumo medio de la población del sudeste asiático (588 g/día), sólo para el arroz de mayor concentración en As inorgánico (0,253  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps), se produciría una ingesta próxima al valor toxicológico de referencia, indicando que el arroz puede suponer un riesgo en poblaciones con dietas de subsistencia de este cereal.

Recientemente en la 72ª Conferencia del Comité de Expertos FAO/WHO en Aditivos Alimentarios (JECFA), la ISTP de As inorgánico ha sido eliminada por hallarse dentro del intervalo de la Dosis Bechmark (BMDL<sub>0,5</sub>). Esta dosis de referencia es de 3  $\mu\text{g As inorgánico}/\text{kg peso corporal}/\text{día}$  (intervalo = 2-7  $\mu\text{g}/\text{kg peso corporal}/\text{día}$ ) (WHO, 2010). Únicamente la ingesta de 148,8  $\mu\text{g As inorgánico}/\text{día}$  correspondiente a la máxima concentración de As inorgánico y mayor consumo del cereal (tabla 13) se halla dentro del intervalo de la BMLD<sub>0,5</sub>.

**Tabla 13.** Ingestas diarias de As inorgánico estimadas a partir del consumo de los arroces crudos analizados y comparación con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS

As inorgánico en arroz crudo <sup>a</sup>	Consumo arroz	Ingesta As inorgánico	Relación Ingesta/IDT <sup>b</sup>
Mínima	16 g/día <sup>c</sup>	0,43 µg As inorgánico/día	0,3%
0,027 µg g <sup>-1</sup> (ps)	588 g/día <sup>d</sup>	15,9 µg As inorgánico/día	11%
Media	16 g/día <sup>c</sup>	1,82 µg As inorgánico/día	1,2%
0,114 µg g <sup>-1</sup> (ps)	588 g/día <sup>c</sup>	67,0 µg As inorgánico/día	45%
Máxima	16 g/día <sup>c</sup>	4 µg As inorgánico/día	3%
0,253 µg g <sup>-1</sup> (ps)	588 g/día <sup>d</sup>	148,8 µg As inorgánico/día	99%

<sup>a</sup> Concentración mínima, media y máxima de As inorgánico (µg g<sup>-1</sup> ps) en las muestras de arroz crudo analizadas en este capítulo (tabla 12)

<sup>b</sup> Ingesta Diaria Tolerable (IDT) = 2,1 µg de As inorgánico/kg peso corporal/día. Para adultos, asumiendo un peso de 70 kg, la IDT equivale a 150 µg As inorgánico/día

<sup>c</sup> Consumo de arroz crudo de la población española (AESAs, 2006)

<sup>d</sup> Consumo medio de arroz en el sudeste asiático (FAOSTAT, 2007)

En la tabla 14 se estima la ingesta de As inorgánico en base a los datos de As inorgánico en arroces cocinados hallados en este estudio y a los distintos datos de consumo. Únicamente con la muestra de menor concentración se obtienen ingestas de As inorgánico inferiores al valor de referencia toxicológico. Este resultado indica que el aporte de As inorgánico a través del arroz consumido en poblaciones que superan  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  en su agua de bebida debería ser considerado en la evaluación del riesgo. Trabajos previos que evaluaron la ingesta de As inorgánico a través del consumo de alimentos cocinados en áreas endémicas en As de Chile y Bangladesh, han puesto de manifiesto que los alimentos pueden contribuir en mayor medida a la ingesta del tóxico que el agua de bebida (Díaz *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006).

**Tabla 14.** Ingestas diarias de As inorgánico estimadas a partir del consumo de los arroces cocinados analizados y comparación con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS

As inorgánico en arroz cocinado	Consumo arroz	Ingesta As inorgánico	Relación Ingesta/IDT <sup>a</sup>
Mínima <sup>c</sup> 0,127 µg g <sup>-1</sup> (ph)	225 g/día <sup>e</sup>	28,6 µg As inorgánico/día	19%
	750 g/día <sup>f</sup>	95,3 µg As inorgánico/día	64%
	1500 g/día <sup>g</sup>	190,5 µg As inorgánico/día	x 1,3
Máxima <sup>d</sup> 1,23 µg g <sup>-1</sup> (ph)	225 g/día <sup>e</sup>	276,8 µg As inorgánico/día	x 1,8
	750 g/día <sup>f</sup>	922,5 µg As inorgánico/día	x 6,2
	1500 g/día <sup>g</sup>	1845 µg As inorgánico/día	x 12,3

<sup>a</sup> Ingesta Diaria Tolerable (IDT) = 2,1 µg de As inorgánico/kg peso corporal/día. Para adultos, asumiendo un peso de 70 kg, la IDT equivale a 150 µg As inorgánico/día

<sup>b</sup> BMDL<sub>0,5</sub> = 3 µg de As inorgánico/kg peso corporal/día (rango = 2-7 µg de As inorgánico/kg peso corporal/día). Para adultos, asumiendo un peso de 70 kg, la BMDL<sub>0,5</sub> equivale a 210 µg/día (140-490 µg/día)

<sup>c</sup> Concentración mínima hallada en los arroces cocinados analizados en este trabajo. Arroz blanco de grano largo cocinado con agua conteniendo 0,1 µg mL<sup>-1</sup> As(V)

<sup>d</sup> Concentración máxima hallada en los arroces cocinados analizados en este trabajo. Arroz integral de grano medio cocinado con agua conteniendo 1 µg mL<sup>-1</sup> As(V)

<sup>e</sup> Consumo de arroz cocinado en Taiwán (Schoof *et al.*, 1998)

<sup>f</sup> Consumo de arroz cocinado en Oeste de Bengala (Roychowdhury *et al.*, 2003)

<sup>g</sup> Consumo de arroz cocinado en Bangladesh (Bae *et al.*, 2002)

Finalmente indicar que para una mejor aproximación a la estimación del riesgo, la biodisponibilidad del As inorgánico a partir del arroz cocinado es un aspecto que debería ser tenido en cuenta. Según nuestro conocimiento, existen escasos antecedentes de investigaciones en esta área. Laparra y colaboradores (2005) y Ackerman y colaboradores (2005) han puesto de manifiesto que la bioaccesibilidad de As inorgánico puede alcanzar entre 63–99% del As inorgánico existente en el arroz cocinado. Recientemente, Juhasz y colaboradores (2006) han realizado estudios *in vivo* en cerdos para la estimación de la biodisponibilidad del As en arroz cocinado, evidenciando una biodisponibilidad del 89% para el As(V) y del 33% para el DMA presentes en el arroz. Los primeros resultados obtenidos a partir de estos tres trabajos indican la necesidad de continuar los estudios en esta línea de investigación con vistas a una estimación más realista del posible riesgo resultante de la ingesta dietética de este contaminante.



## **5.2. Especies arsenicales y bioaccesibilidad en arroces comercializados en Argentina y Bolivia**

*Argentina es el tercer país productor de arroz en MERCOSUR y Bolivia reemplaza su déficit local importando arroz de Argentina. Se han llevado a cabo muy pocos estudios en arroz latinoamericano. El presente capítulo contribuye a la caracterización del arsénico en arroces comercializados en ambos países y a la evaluación de los riesgos derivados de su consumo. Para ello se ha considerado tanto la concentración de arsénico total e inorgánico en el producto, como la bioaccesibilidad sobre la evaluación del riesgo, mediante la estimación de la concentración de As total y especies arsenicales en la fracción soluble del producto crudo y cocinado con agua desionizada. Con este propósito se analizaron muestras de arroz comercializadas en Buenos Aires (Argentina) y Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) en diferentes épocas de un año. Los aspectos relativos a materiales y métodos correspondientes a este estudio se han descrito en los capítulos anteriores de la presente tesis. En las páginas siguientes se muestran los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.*

Se han analizado muestras de arroz ( $n = 59$ ) adquiridas en diversos comercios de Buenos Aires (Argentina) y Santa Cruz de la Sierra (Bolivia). Las muestras incluyen diversos tipos de grano (redondo y largo), sometidos a distintos procesos industriales (integral, blanco, sancochado, dorado) y con diferentes lugares de producción (Argentina, Bolivia, Brasil y Uruguay). Se analiza el As total e inorgánico en las muestras crudas. Parte de las muestras crudas ( $n = 8$ ) se somete a una digestión gastrointestinal *in vitro* analizándose el As total y las especies arsenicales en la fracción bioaccesible mediante HPLC-termooxidación-HG-AFS. Otras muestras ( $n = 16$ ) se cocinan con agua desionizada (proporción arroz en agua = 1:4) hasta la evaporación total del líquido, y tras una digestión gastrointestinal *in vitro* de los arroces se determina en la fracción bioaccesible la concentración de As total y las especies arsenicales mediante trampa criogénica-HG-AAS.

### 5.2.1. Arsénico total en arroz crudo

Las concentraciones de As total en los arroces comercializados en Argentina y Bolivia analizados en este trabajo (tabla 15) oscilan entre 0,032 y 0,970  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (mediana = 0,297  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps). En las muestras de arroz blanco ( $n = 47$ ), la concentración de As total (mediana = 0,293  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) está próxima a la hallada en los arroces integrales ( $n = 12$ ) (mediana = 0,353  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps). En la bibliografía también se ha descrito que las concentraciones de As total son similares en ambos tipos de arroces (Williams *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2010). Este hecho también se ha puesto de manifiesto en el capítulo anterior de esta tesis.

Las concentraciones de As total en función del país de producción muestran la siguiente gradación: Bolivia (mediana =  $0,248 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ps}$ ) < Brasil ( $0,280 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ps}$ )  $\approx$  Argentina (mediana =  $0,296 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ps}$ ) < Uruguay (mediana =  $0,386 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ps}$ ). Las concentraciones de As total en arroces de Entre Ríos, una de las zonas de mayor producción en Argentina, no muestran diferencias significativas respecto a los arroces cultivados en otras zonas de este país (figura 6a). Tampoco existen diferencias significativas entre los arroces argentinos y los producidos en Bolivia y Uruguay.

En las tres provincias argentinas se han detectado elevadas concentraciones de As total [Entre Ríos ( $0,480 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ps}$ ), Misiones ( $0,451 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ps}$ ) y Corrientes ( $0,690 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ps}$ )]. Determinadas áreas de Argentina presentan concentraciones de arsénico muy elevadas en suelos y aguas subterráneas debido a causas de origen natural. La llanura Chacopampeana es una de las zonas del mundo con las aguas subterráneas de más alta concentración en As (Smedley *et al.*, 2009). A pesar de ello, y debido a que vastas extensiones de Argentina son semiáridas, el agua subterránea constituye un recurso importante para el abastecimiento público y privado. Entre Ríos pertenece a esta área geográfica y en ella ha habido un importante crecimiento en la producción de arroz en los departamentos de Uruguay, Colón, San Salvador y Villaguay, áreas donde las arroceras son regadas principalmente por agua de pozo debido a que la introducción de otro sistema de riego requiere nuevos proyectos con elevados costes de inversión (Producción de arroz en Entre Ríos, 2010). La posible presencia de altas concentraciones de As en alguno de estos pozos de esta zona

podría afectar a la concentración de As total en los arroces, si bien se desconoce si en Argentina existen investigaciones al respecto.

Los datos existentes sobre As total en países latinoamericanos son muy escasos. Zavala y Duxbury (2008) han hallado un valor medio  $<0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  ps en 12 muestras de arroz de Venezuela, concentración ampliamente superada en las muestras de este trabajo. Por su parte, Meharg y colaboradores (2008b) han cuantificado  $0,510 \text{ mg kg}^{-1}$  ps de As en una muestra de arroz de Uruguay, valor próximo a los hallados en arroces uruguayos de este trabajo. Por el contrario, existe una extensa bibliografía sobre las concentraciones de As total en arroces producidos o consumidos en Norteamérica, Asia y Europa (Schoof *et al.*, 1998; Phoung *et al.*, 1999; D'Illio *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2007; Jorhem *et al.*, 2008; Pal *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010).

Los numerosos estudios existentes sobre As total en arroz (tabla 16) han evidenciado que existe una amplia variabilidad en las concentraciones, debido posiblemente a una combinación de factores medioambientales, de cultivo y genéticos que controlan la disponibilidad, absorción y traslocación del As en arroz (Zavala y Duxbury 2008). Recientemente Zavala y Duxbury (2008) introdujeron el concepto de rango global “normal” para las concentraciones de As total ( $0,082\text{-}0,202 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  ps). Para ello se basaron en los datos de As obtenidos para el 50% de las 411 muestras de arroz comercializadas en distintos países. Al revisar los datos obtenidos posteriormente por otros autores (Rahman *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010), así como los datos presentados en el capítulo 5.1 de esta tesis, se constata

que más del 67% de las muestras se encuentran dentro de este rango “normal”. Sin embargo, sólo el 15% de los arroces latinoamericanos aquí analizados están dentro de este intervalo, y el 78% de ellos lo superan. Sería de interés realizar una investigación más exhaustiva en arroces procedentes de Argentina, Bolivia y otros países latinoamericanos con el objeto de obtener una línea base para esta área geográfica y corroborar si es habitual una concentración elevada de As total, dilucidando asimismo si este hecho es debido a factores de cultivo o genéticos.

En los arroces latinoamericanos aquí analizados, la mediana de las concentraciones de As total se encuentra dentro del rango de las medianas de arroces de EE. UU. y Europa descritos en la bibliografía ( $0,13-0,25 \mu\text{g g}^{-1}$  ps), siendo superior al rango hallado en muestras producidas en países asiáticos ( $0,07-0,18 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) (Zavala *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Zavala y Duxbury 2008; Meharg *et al.*, 2009). Estos resultados podrían indicar que la alarma que se ha generado en países asiáticos por exposición a As a través del arroz estaría más relacionada con el elevado consumo del cereal y/o el uso de agua contaminada con As para cocinarlo, que con un nivel alto en el producto crudo.

### 5.2.2. Arsénico inorgánico en arroz crudo

Las concentraciones de As inorgánico (tabla 15), oscilan entre  $0,020$  y  $0,344 \mu\text{g g}^{-1}$  ps (mediana =  $0,109 \mu\text{g g}^{-1}$  ps). Los valores extremos se han cuantificado en una muestra de Bolivia y Uruguay, respectivamente. Tanto el rango de concentraciones como la mediana son muy inferiores a los descritos para As total, hecho que supone un cambio importante en la

estimación del riesgo asociado a la presencia de As en este cereal. Los porcentajes de As inorgánico respecto al As total oscilan entre el 14% y el 100%, rango que engloba los valores reportados por otros autores (10-99%) (Williams *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008).

La concentración de As inorgánico es más elevada en arroz integral (mediana =  $0,140 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 8$ ) que en arroz blanco (mediana =  $0,106 \mu\text{g g}^{-1}$  ps;  $n = 42$ ), hecho ya evidenciado previamente en el capítulo 5.1 de esta tesis. Este As inorgánico, principalmente en la forma de As(III), ha sido localizado en la parte más externa del grano, en la región correspondiente al pericarpio y a la capa de aleurona, partes que son eliminadas para la obtención del arroz blanco (Sun *et al.*, 2008; Meharg *et al.*, 2008a; Lombi *et al.*, 2009).

Las concentraciones de As inorgánico son muy similares en los distintos países productores: Argentina (mediana =  $0,104 \mu\text{g g}^{-1}$  ps), Bolivia (mediana =  $0,110 \mu\text{g g}^{-1}$  ps), Uruguay (mediana =  $0,111 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) y Brasil ( $0,119 \mu\text{g g}^{-1}$  ps). Sólo existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de As inorgánico de los arroces producidos en Entre Ríos y en Uruguay, tal y como se evidencia en la figura 6b. Hasta nuestro conocimiento, el único antecedente bibliográfico sobre As inorgánico en arroces de países sudamericanos ha sido reportado en una muestra de arroz de Uruguay ( $0,123 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Meharg *et al.*, 2008b). El valor medio de As inorgánico de los arroces cultivados en Latinoamérica analizados en el presente trabajo ( $0,111 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) está muy próximo al valor medio reportado para arroces procedentes de EE. UU., Europa y Asia, situado en torno a  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$  ps (tabla 17). Estas concentraciones de As

inorgánico en arroz son similares a las descritas en productos de la pesca y algas (Muñoz *et al.*, 2000; Almela *et al.*, 2006).

En la bibliografía se han definido dos tipos de arroces en función de la relación existente entre el As total y las especies arsenicales (Zavala *et al.*, 2008). Con objeto de estudiar cuál sería la clasificación de los arroces latinoamericanos aquí analizados, se ha realizado un análisis de regresión del As inorgánico frente al As total, tanto para arroces blancos como para integrales (figura 7). El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) es bajo para el arroz blanco ( $r^2 = 0,387$ ), del orden del descrito en la bibliografía para arroces del tipo DMA en los cuales la concentración de DMA se incrementa al aumentar el As total. Por el contrario, los arroces integrales presentan un coeficiente de correlación más elevado ( $r^2 = 0,791$ ), por lo que podrían clasificarse como del tipo As inorgánico. La mayoría de los arroces blancos de EE. UU. pertenece al tipo DMA (Zavala *et al.*, 2008; Meharg *et al.*, 2009), siendo los arroces de países asiáticos de tipo As inorgánico (Meharg *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010). Asumiendo que la especiación de arsénico depende más de la genética que de las condiciones ambientales (Zavala *et al.*, 2008), los arroces blancos de EE. UU y de países latinoamericanos podrían presentar similitudes genéticas.

En base a los datos obtenidos y desde el punto de vista de la evaluación del riesgo, las autoridades sanitarias deberían emitir recomendaciones de comercialización o consumo teniendo en cuenta las concentraciones de As inorgánico. Comparando los datos obtenidos en este trabajo con la única legislación existente para As inorgánico en arroz vigente en China ( $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Heikens, 2006), se evidencia que un 13% de las muestras de los países

latinoamericanos analizadas superaría este valor. Teniendo en cuenta el importante comercio internacional del arroz y el probable establecimiento de medidas de regulación para As inorgánico en un mayor número de países, sería de utilidad disponer de metodologías analíticas fiables y de fácil aplicación con vistas a la regulación del comercio internacional. Adicionalmente, el establecimiento de límites en función de la concentración de As inorgánico podría favorecer a regiones productoras en las que una alta concentración de As total en el arroz, podría estar restringiendo su comercialización.

Los productos derivados del arroz como leche de arroz, arroz infantil, arroz de desayuno y galletas de arroz que también pueden presentar concentraciones elevadas de As inorgánico (Meharg *et al.*, 2008b,c; Sun *et al.*, 2009; EFSA, 2009), también deberían ser objeto de estudio.



**Tabla 15.** Concentraciones de As total (As-t), As inorgánico (As-i) en arroces latinoamericanos crudos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) y porcentajes de As-i con respecto al As-t

Procedencia	Grano		As-t	As-i	% (As-i/As-t)
ARGENTINA					
Provincia de Entre Ríos	Blanco	Largo, ancho	0,293	0,051	17
	Blanco	Largo, ancho	0,210	0,065	31
	Blanco	Largo, ancho	0,307	0,077	25
	Blanco	Largo, ancho	0,295	0,084	28
	Blanco	Largo, ancho	0,381	0,061	16
	Blanco	Largo, ancho	0,297	0,126	42
	Blanco	Largo, fino	0,138	0,068	49
	Blanco	Largo, fino	0,480	0,116	24
	Blanco	Largo, fino	0,441	0,129	29
	Blanco	Largo, fino	0,250	n.a	—
	Blanco	Largo, fino	0,250	n.a	—
	Blanco; Arroz Dorado	—	0,287	0,108	38
	Blanco Thasmin	Largo	0,220	0,098	45
	Blanco Carnalori	Largo, grueso	0,440	0,104	24
	Blanco Koshihikari	Corto	0,290	0,062	21
	Integral	Largo, fino	0,347	0,083	24
	Integral	—	0,440	n.a	—
	Integral	—	0,439	0,123	28
Provincia de Misiones	Blanco	Largo, fino	0,451	0,116	26
	Blanco	Largo, ancho	0,032	0,023	72
Provincia de Corrientes	Blanco	Largo, fino	0,690	0,170	25
	Blanco	Largo, fino	0,166	0,058	35
	Integral	—	0,334	0,133	40

**Tabla 15.** Continuación

Procedencia	Grano		As-t	As-i	% (As-i/As-t)
ARGENTINA					
Provincia no especificada	Blanco	—	0,486	0,123	25
	Blanco	—	0,282	0,062	22
	Blanco	—	0,374	0,082	22
	Blanco	Largo	0,970	0,131	14
	Blanco	Largo fino	0,284	0,081	29
	Blanco	Largo fino	0,217	0,122	56
	Blanco	Largo fino	0,280	n.a	—
	Blanco	Largo fino/sancochado	0,352	0,108	31
	Blanco	Largo fino/perlado	0,815	0,184	23
	Blanco	Largo glaseado	0,098	0,098	100
	Blanco	Largo fino	0,130	n.a	—
	Blanco	Arroz GUISERO	0,250	n.a	—
	Integral (yamani)	Largo	0,310	n.a	—
	Integral	Largo	0,130	n.a	—
	Integral	Largo fino	0,655	0,300	46
	Integral	Largo fino sancochado	0,360	0,147	41
	Integral	—	0,170	n.a	—

**Tabla 15.** Continuación

Procedencia	Grano		As-t	As-i	% (As-i/As-t)
BOLIVIA					
Provincia no especificada	Blanco	Extra largo fino	0,380	0,164	43
	Blanco	Extra largo fino	0,511	0,154	30
	Blanco	Largo	0,175	0,079	45
	Blanco	Largo	0,182	0,110	60
	Blanco	Largo fino	0,303	0,156	51
	Blanco	Largo fino	0,248	0,145	58
	Blanco	Largo fino	0,624	0,093	15
	Blanco	Largo abrillantado	0,294	0,132	45
	Blanco	Largo abrillantado	0,076	0,049	62
	Blanco	Largo/paella	0,077	0,066	86
	Blanco	Redondo	0,064	0,020	31
	Integral	Largo, fino	0,145	0,071	49
	Integral	Largo, fino	0,465	0,183	39
URUGUAY					
Provincia no especificada	Blanco	Largo fino	0,351	0,062	18
	Blanco	Largo fino	0,386	0,133	34
	Blanco	Largo fino/sancochado	0,360	0,111	31
	Blanco	Redondo	0,471	0,110	23
	Integral	Largo fino	0,596	0,344	58
BRASIL					
Provincia no especificada	Blanco	Largo fino	0,280	0,119	43

n.a.: no analizado

### 5.2.3. Riesgo toxicológico

El reciente documento sobre arsénico emitido por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria pone de manifiesto que los cereales y derivados de cereales son el grupo de alimentos que contribuyen en mayor medida a la ingesta de As inorgánico por parte de la población europea (EFSA, 2009). El aporte de arsénico inorgánico de este grupo de alimentos representa entre 0,18  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/día (límite inferior) y 0,22  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/día (límite superior). El arroz podría ser uno de los alimentos que contribuyese en mayor medida a la ingesta. En el mismo documento se estima que los consumidores extremos de arroz en Europa, como son determinados grupos étnicos, pueden tener una ingesta diaria de As inorgánico de 1  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/día, lo cual representa el 50% del límite inferior indicado por la  $\text{BMDL}_{0,5}$  (2–7  $\mu\text{g}$  As inorgánico/kg peso corporal/día).

En base a los datos disponibles, el consumo medio de arroz en Argentina se estima en 6 kg/persona/año (S.A.G.P. y A., 2010) y en Bolivia en 37 kg/persona/año (Ortiz y Solís, 2007). Considerando el límite inferior (0,020  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) y superior (0,344  $\mu\text{g g}^{-1}$  dw) de concentración de As inorgánico hallados en las muestras analizadas y los consumos diarios de arroz en ambos países (16 g/día en Argentina; 101 g/día en Bolivia), se pueden estimar ingestas de este contaminante para la población adulta considerando un peso corporal de 70 kg. En Argentina, la ingesta de As inorgánico oscilaría entre 0,005 y 0,079  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/día, siendo superior en Bolivia (0,029 y 0,496  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/día). Dichas ingestas son muy inferiores a la  $\text{BMDL}_{0,5}$ . No obstante, en ciertas áreas rurales de Latinoamérica la población sólo tiene acceso a agua con concentraciones de

As que superan ampliamente los  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  (Calatayud *et al.*, 2008) y cuyo uso para el cocinado del arroz podría dar lugar a ingestas elevadas de As inorgánico.

Considerando los datos publicados sobre As inorgánico en arroces cultivados en distintas regiones del planeta, para los que la concentración media es de  $0,1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  tal y como se ha comentado con anterioridad, ni siquiera con ingestas de  $400 \text{ g/día}$ , únicamente descritas en algunos países asiáticos (FAOSTAT, 2010), se alcanzaría el valor inferior del rango de la  $\text{BMDL}_{0,5}$  ( $2\text{--}7 \text{ } \mu\text{g inorganic As/kg peso corporal/día}$ ). Este resultado muestra que el arroz no debería ser globalmente considerado un alimento de riesgo.

**Tabla 16.** Concentraciones de As total en arroz publicadas recientemente en la bibliografía

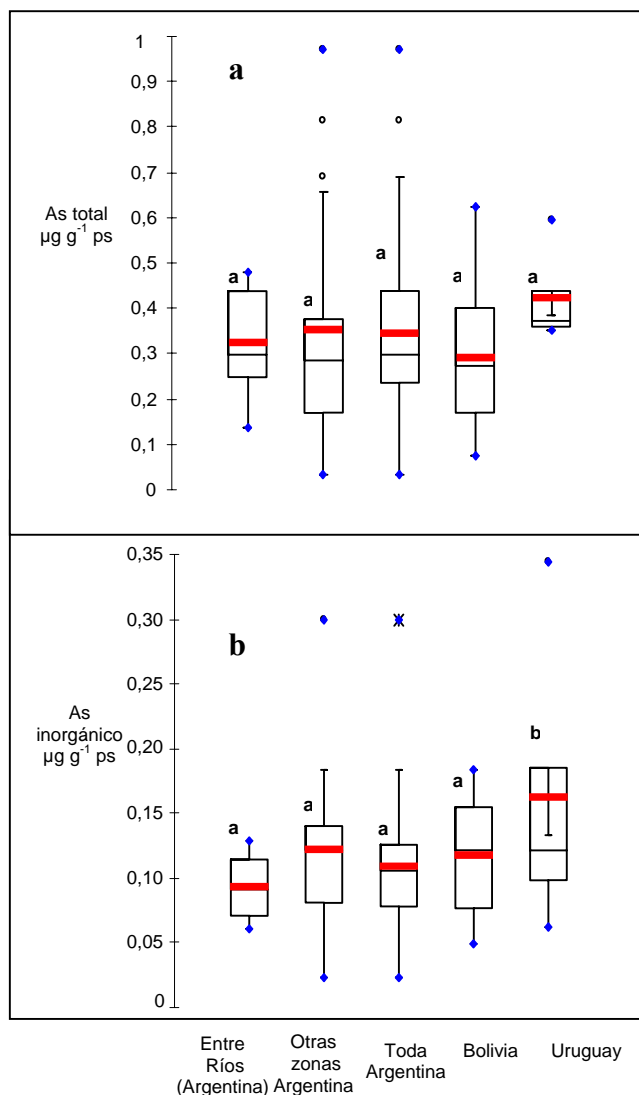
Rango ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps)	Media ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps)	n	Países de producción	Referencia
0,008-0,714	<0,2	204	España, Italia, EE. UU., Venezuela, India, Tailandia, Bangladesh, Pakistán, otros	Zavala y Duxbury, 2008
0,058-0,406	0,19	39	España, Francia, Italia, Canadá, EE. UU., India, Tailandia	Capítulo 5.1 de la presente tesis
0,015-0,586	0,114	480	China	Zhu <i>et al.</i> , 2008
0,32-0,75	0,56	6	China, Bangladesh	Sun <i>et al.</i> , 2008
0,01-0,82	0,15	901	España, Francia, Italia, EE. UU., Egipto, Bangladesh, China, Japón, India, Tailandia	Meharg <i>et al.</i> , 2009
0,021-0,138	0,111	312	India	Pal <i>et al.</i> , 2009
0,002-0,557	0,143	214	Bangladesh	Rahman <i>et al.</i> , 2009
<LD-1,18	0,142	1122	Países europeos	EFSA, 2009
0,065-0,274	0,114	22	China	Liang <i>et al.</i> , 2010

**Tabla 17.** Concentraciones de As inorgánico en arroz publicadas recientemente en la bibliografía

Rango ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps)	Media ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ps)	n	Países de producción	Referencia
0,0520-0,252	0,118	24	EE. UU.	Zavala <i>et al.</i> , 2008
0,027-0,253	0,114	39	España, Francia, Italia, Canadá, EE. UU., India, Tailandia	Capítulo 5.1 de la presente tesis
0,063-0,379	0,151	38	China	Zhu <i>et al.</i> , 2008
0,17-0,33	0,21	6	China, Bangladesh	Sun <i>et al.</i> , 2008
0,111-0,175	—	10	Delta de Bengala, Vietnam	Agusa <i>et al.</i> , 2009
0,01-0,38	—	63	Italia, EE. UU., China, India, Bangladesh	Meharg <i>et al.</i> , 2009
0,049-0,217	0,082	22	China	Liang <i>et al.</i> , 2010

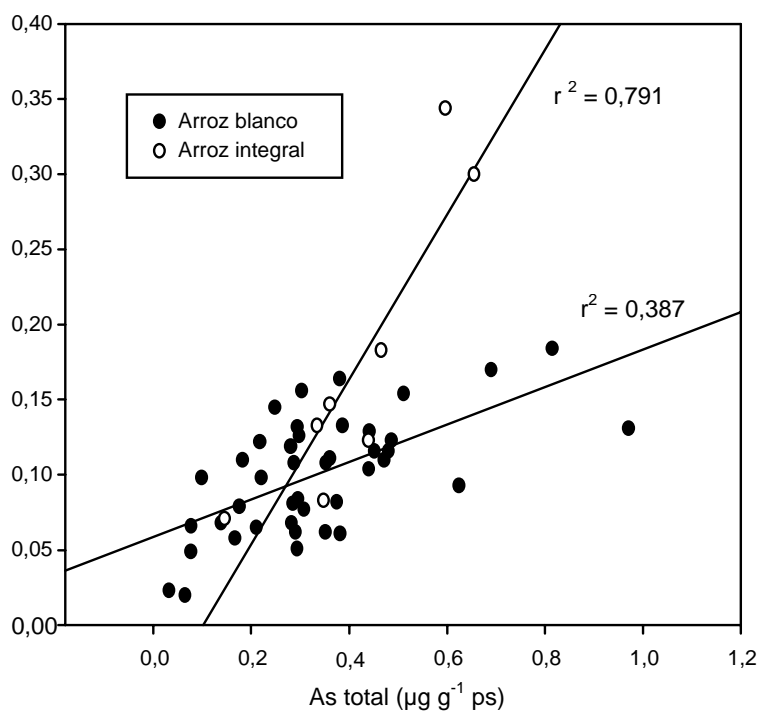
**Figura 6.** Concentraciones de As total (6a) y As inorgánico (6b) en arroces latinoamericanos crudos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) de acuerdo a su área de producción

\* La caja representa la concentración del arroz comprendida entre los percentiles 25 y 75. Las barras de error por encima y por debajo de la caja indican los percentiles 5 y 95. Los puntos encima y debajo de las cajas representan valores anómalos. Las líneas que dividen la caja representan la media (barra gruesa) y la mediana (barra fina). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).





**Figura 7.** Correlación entre las concentraciones de As total y As inorgánico en arroces latinoamericanos blancos e integrales crudos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps)



#### **5.2.4. Arsénico total, arsénico inorgánico y especies arsenicales bioaccesibles en arroces crudos**

Con objeto de estudiar la bioaccesibilidad de arroces crudos, ocho muestras de arroces cultivados en Argentina se han sometido a una digestión gastrointestinal *in vitro*. En la fracción soluble se ha determinado la concentración de As total, As inorgánico y especies arsenicales (tabla 18).

Las concentraciones de As total de la fracción soluble de los arroces crudos varían entre 0,190 y 0,442  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (media  $\pm$  SD =  $0,309 \pm 0,085 \mu\text{g g}^{-1}$  ps). Este resultado indica que un alto porcentaje del As total (64%-98%) se solubiliza tras la digestión gastrointestinal y se encontraría disponible por tanto para su posterior absorción por el epitelio intestinal. Las concentraciones de As inorgánico en la fracción soluble oscilan entre 0,055 y 0,122  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps (media  $\pm$ SD =  $0,080 \pm 0,023 \mu\text{g g}^{-1}$  ps), habiéndose solubilizado entre el 70% y el 90% del As inorgánico.

El análisis de la fracción bioaccesible mediante HPLC-termooxidación-HG-AAS pone de manifiesto que As(V) y DMA son las únicas especies detectables. El As(V), la única especie inorgánica presente, supone como media un 25% del As total bioaccesible, siendo el DMA la especie mayoritaria con concentraciones que oscilan entre 0,157 y 0,320  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps.

**Tabla 18.** Concentraciones de As total (As-t) y As inorgánico (As-i) en los arroces latinoamericanos crudos y concentraciones de As-t, As-i y especies arsenicales [DMA y As(V)] en la fracción bioaccesible de dichos arroces ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps)

Origen de producción	Tipo de arroz	Arroz crudo		Fracción bioaccesible				
		As-t	As-i	As total bioaccesible	As-i bioaccesible	As(V) bioaccesible	DMA bioaccesible	Especies/ As total %
Entre Ríos (Argentina)	Doble Carolina	0,210 ± 0,008	0,079 ± 0,002	0,190 ± 0,014	0,055 ± 0,005	0,051 ± 0,001	0,163 ± 0,003	113
Entre Ríos (Argentina)	Doble Carolina	0,307 ± 0,003	0,072 ± 0,002	0,301 ± 0,027	0,064 ± 0,007	0,063 ± 0,002	0,237 ± 0,005	100
Entre Ríos (Argentina)	Largo, fino	0,690 ± 0,009	0,137 ± 0,006	0,442 ± 0,045	0,122 ± 0,011	0,117 ± 0,001	0,320 ± 0,003	99
Entre Ríos (Argentina)	Integral	0,347 ± 0,001	0,083 ± 0,009	0,308 ± 0,037	0,075 ± 0,005	0,070 ± 0,001	0,234 ± 0,006	99
Entre Ríos (Argentina)	Blanco	0,441 ± 0,011	0,129 ± 0,009	0,401 ± 0,035	0,098 ± 0,009	0,097 ± 0,001	0,299 ± 0,002	99
Entre Ríos (Argentina)	Integral	0,439 ± 0,035	0,123 ± 0,004	0,336 ± 0,004	0,096 ± 0,003	0,097 ± 0,003	0,235 ± 0,007	83
Argentina	—	0,282 ± 0,016	0,075 ± 0,002	0,230 ± 0,015	0,065 ± 0,006	0,065 ± 0,005	0,157 ± 0,004	97
Argentina	—	0,374 ± 0,018	0,082 ± 0,003	0,270 ± 0,007	0,066 ± 0,002	0,065 ± 0,004	0,272 ± 0,004	125

\* Valores expresados como media ± SD (n = 3)

### 5.2.5. Arsénico y especies arsenicales bioaccesibles en arroces cocinados

Con objeto de evaluar la bioaccesibilidad del arroz tal y como es consumido por la población, se cocinaron muestras de arroces por cocción hasta la evaporación total del agua desionizada adicionada.

Las concentraciones de As total en los arroces cocinados oscilan entre 0,012 y 0,121  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph (tabla 19). Tras aplicar la digestión gastrointestinal *in vitro*, la concentración bioaccesible oscila entre 0,012 y 0,114  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph, indicando que la práctica totalidad (95%) del As total inicial en el arroz cocinado se solubiliza tras la digestión gastrointestinal. Este hecho coincide con lo constatado en estudios previos que también han puesto de manifiesto la alta bioaccesibilidad de As en arroces cocinados (>84%) (Ackermann *et al.*, 2005; Laparra *et al.*, 2005). En consecuencia, la estimación del riesgo asociado a la presencia de As en arroz cocinado no se modificaría al considerar la bioaccesibilidad.

Las concentraciones bioaccesibles de As inorgánico oscilan entre 0,007 y 0,028  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph (tabla 19). En todas las muestras las concentraciones bioaccesibles de As(III) (0,004–0,018  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph) y As(V) (0,003–0,015  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph) son muy similares, representando respectivamente el 14% y 12% del As total bioaccesible. El DMA es la especie mayoritaria en la fracción bioaccesible (67% del total), con concentraciones que oscilan entre 0,011 y 0,078  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph.

Al igual que en el arroz, también se han descrito bioaccesibilidades elevadas de As en algas y pescados tanto crudos como cocinados (Laparra *et al.*, 2003; Almela *et al.*, 2005; Laparra *et al.*, 2007). No ocurre lo mismo

para otros elementos traza tóxicos como Cd, Pb y Hg, en los que se ha descrito que el cocinado reduce significativamente la bioaccesibilidad obtenida en el producto crudo, siendo además estas bioaccesibilidades muy inferiores a las descritas para el As: Hg < 49%; Cd < 34%; Pb < 20% (Amiard *et al.*, 2008; Metian *et al.*, 2009; capítulo 5.4 de esta tesis). Por ello, si la bioaccesibilidad llegara a ser considerada en la estimación del riesgo, la influencia del alimento y del cocinado sobre la misma debería ser evaluada para cada tóxico.

**Tabla 19.** Concentraciones de As total (As-t) en los arroces latinoamericanos cocinados y concentraciones de As-t y especies arsenicales [As inorgánico (As-i), As(III), As(V), DMA] en la fracción bioaccesible de dichos arroces ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ph)

Origen de producción	Tipo de arroz	As-t arroz cocinado <sup>b</sup>	As-t bioaccesible <sup>b</sup>	As-i bioaccesible <sup>b, c</sup>	As(III) bioaccesible <sup>b</sup>	As(V) bioaccesible <sup>b</sup>	DMA bioaccesible	Recuperación bioaccesible <sup>d</sup>
Entre Ríos	Blanco, grano largo	0,087	0,084	0,013	0,006	0,007	0,052	77
	Blanco, grano largo	0,046	0,043	0,015	0,007	0,008	0,026	95
	Blanco, grano largo	0,090	0,076	0,018	0,008	0,010	0,038	74
	Grano largo fino	0,062	0,050	0,009	0,006	0,003	0,038	94
	Blanco, grano largo	0,061	0,056	0,013	0,007	0,006	0,031	79
	Blanco, grano largo	0,023	0,022	0,009	0,006	0,003	0,011	91
	Integral	0,083	0,080	0,022	0,009	0,013	0,055	96
	Blanco	0,119	0,098	0,028	0,018	0,010	0,078	108
	Blanco, grano largo	0,068	0,067	0,022	0,011	0,010	0,042	96
	Blanco	0,032	0,028	0,007	0,004	0,003	0,023	107
	Blanco, grano largo	0,097	0,099	0,026	0,009	0,015	0,074	101
	Blanco, grano largo	0,071	0,069	0,015	0,008	0,007	0,051	96

**Tabla 19.** Continuación

Origen de producción	Tipo de arroz	As <sub>t</sub> arroz cocinado <sup>b</sup>	As-t bioaccesible <sup>b</sup>	As-i bioaccesible <sup>b, c</sup>	As(III) bioaccesible <sup>b</sup>	As(V) bioaccesible <sup>b</sup>	DMA bioaccesible	Recuperación bioaccesible <sup>d</sup>
Misiones	Blanco, grano largo	0,081	0,054	0,015	0,011	0,004	0,036	94
	Blanco, grano largo	0,012	0,012	0,012	0,007	0,005	<0,002	100
Corrientes	Blanco, grano largo	0,039	0,038	0,013	0,007	0,006	0,026	103
	Blanco, grano largo	0,121	0,114	0,026	0,016	0,010	0,076	89

<sup>a</sup> Las muestras de arroz cocinado se analizaron por duplicado

<sup>b</sup> Valores de bioaccesibilidad obtenidos como media de digestiones gastrointestinales *in vitro* analizadas por duplicado

<sup>c</sup> As(V) bioaccesible como diferencia entre el As inorgánico y el As(III) bioaccesible

<sup>d</sup> Recuperación bioaccesible equivale a  $[\sum \text{species bioaccesibles As}_t \text{ bioaccesible}] \times 100$ , siendo  $\sum \text{species bioaccesibles}$  la suma del As-i bioaccesible y DMA bioaccesible

### **5.3. Bioaccesibilidad de mercurio y metilmercurio en peces espada comercializados en España**

*Las concentraciones de mercurio (Hg) en pez espada (*Xiphias gladius*) constituyen un problema de seguridad alimentaria para algunos países, entre los que se encuentra España. El presente capítulo analiza el riesgo asociado al consumo de este pescado considerando tanto la concentración de mercurio en el producto como la concentración bioaccesible de mercurio y metilmercurio (MeHg) obtenida tras la aplicación de una digestión gastrointestinal in vitro.*

*Con este propósito se analizaron muestras de pez espada comercializadas en España en diferentes épocas de un año. Los aspectos relativos a materiales y métodos correspondientes a este estudio se han descrito en los capítulos anteriores de la presente tesis. En las páginas siguientes se muestran los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.*



### 5.3.1. Mercurio total en pez espada

Se ha analizado la concentración de mercurio en 27 muestras de pez espada comercializadas en España (tabla 20). Las concentraciones oscilan entre 0,413 y 2,11  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso húmedo, ph (media  $\pm$  SD =  $0,958 \pm 0,475 \mu\text{g g}^{-1}$  ph).

Un 37% de las muestras supera el valor de 1  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph, límite máximo de Hg permitido en pez espada por la legislación de la UE y de obligatorio cumplimiento en España (EC, 2008), indicando que se trata de un alimento problemático desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Este resultado es acorde con el elevado número de alertas alimentarias que la UE ha notificado en los últimos años por altas concentraciones de Hg en pescado, el 56% de las cuales correspondían a pez espada (RASFF, 2010).

**Tabla 20.** Concentraciones de Hg total (Hg-t) en muestras de pez espada, concentraciones de Hg-t bioaccesible y bioaccesibilidad de Hg-t

Muestra	Hg-t ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , peso húmedo)	Hg-t bioaccesible ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , peso húmedo)	Bioaccesibilidad <sup>a</sup> (%)
1	$0,440 \pm 0,006$	$0,166 \pm 0,015$	38
2	$0,826 \pm 0,027$	$0,608 \pm 0,017$	74
3	$0,787 \pm 0,051$	$0,299 \pm 0,022$	38
4	$0,779 \pm 0,043$	$0,522 \pm 0,030$	67
5	$0,605 \pm 0,007$	$0,301 \pm 0,025$	50
6	$0,705 \pm 0,073$	$0,542 \pm 0,025$	77

**Tabla 20.** Continuación

<b>Muestra</b>	<b>Hg-t (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>, peso húmedo)</b>	<b>Hg-t bioaccesible (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>, peso húmedo)</b>	<b>Bioaccesibilidad<sup>a</sup> (%)</b>
7	0,748 ± 0,071	0,371 ± 0,022	50
8	0,650 ± 0,023	0,517 ± 0,039	80
9	0,647 ± 0,016	0,466 ± 0,039	72
10	1,05 ± 0,060	0,665 ± 0,065	63
11	1,41 ± 0,01	0,862 ± 0,007	61
12	1,13 ± 0,04	0,622 ± 0,016	55
13	0,439 ± 0,011	0,348 ± 0,006	79
14	0,629 ± 0,002	0,479 ± 0,010	76
15	0,880 ± 0,021	0,514 ± 0,045	58
16	0,939 ± 0,049	0,716 ± 0,010	76
17	1,18 ± 0,04	0,482 ± 0,018	41
18	0,687 ± 0,012	0,486 ± 0,045	71
19	0,782 ± 0,016	0,502 ± 0,006	64
20	1,02 ± 0,09	0,624 ± 0,007	61
21	1,25 ± 0,12	0,928 ± 0,014	74
22	1,20 ± 0,04	0,844 ± 0,004	70
23	2,11 ± 0,18	1,41 ± 0,08	67
24	2,00 ± 0,01	1,66 ± 0,13	83
25	2,08 ± 0,01	1,72 ± 0,13	83
26	0,488 ± 0,031	0,226 ± 0,021	46
27	0,413 ± 0,024	0,206 ± 0,027	50

Los valores están expresados como media ± SD (n = 3).

<sup>a</sup> Bioaccesibilidad =  $\frac{\text{(Hg-t en la fracción bioaccesible de pez espada)}}{\text{(Hg-t en pez espada)}} \times 100$

El análisis de Hg en productos de la pesca comercializados en España es una práctica habitual en los laboratorios de control alimentario, pero son escasos los datos publicados en revistas científicas. El rango de concentraciones de Hg hallado en este trabajo se solapa con los valores reportados en la bibliografía para muestras de pez espada comercializadas en España ( $n = 28$ ):  $0,42\text{--}2,22 \mu\text{g g}^{-1}$  ph (Cabañero *et al.*, 2004; Falcó *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2008). Por otra parte, los valores hallados en este trabajo son similares a los descritos en los últimos seis años en pez espada de distintos orígenes (tabla 21). Sólo en muestras adquiridas en Taiwán se han encontrado concentraciones medias muy superiores ( $3,64 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  ph) (Chen *et al.*, 2007).

En este estudio no se dispone de la información necesaria para relacionar las concentraciones de Hg con las variables fisiológicas o el hábitat de los peces. La bibliografía pone de manifiesto que existe una correlación lineal de las concentraciones de Hg en músculo con la longitud y con la edad de los peces, por hallarse la mayor parte de este Hg en forma de MeHg ligado a los grupos tiol de las proteínas, las cuales se incrementan con la edad (Monteiro y Lopes, 1990; Storelli y Marcotrigliano, 2001; Branco *et al.*, 2004; Branco *et al.*, 2007). También se ha correlacionado la concentración de Hg en el músculo con el área de captura (Branco *et al.*, 2007). Quizás podrían ser utilizadas algunas de estas variables para evitar la captura de peces cuyas concentraciones de Hg impidan su posterior comercialización.

**Tabla 21.** Concentraciones de Hg total en pez espada reportadas en la bibliografía entre 2004 y 2009

Origen (especificado en referencia)	Hg-t ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , peso húmedo)			n	Referencia
	mínimo	máximo	media		
España	–	–	$0,42 \pm 0,01$	1	Cabañero <i>et al.</i> , 2004
Canadá (puntos de venta de mariscos)	0,40	3,85	1,82	10	Forsyth <i>et al.</i> , 2004
Mar Mediterráneo	0,02	0,15	$0,07 \pm 0,04$	58	Storelli <i>et al.</i> , 2005
Supermercados en EE. UU.	0,15	3,07	$1,40 \pm 0,18$	18	Burger y Gochfeld, 2006
España	–	–	1,59-2,22	3	Falcó <i>et al.</i> , 2006
Isla de la Reunión	–	–	$1,24 \pm 0,83$	7	Kojadinovic <i>et al.</i> , 2006
Canal de Mozambique	–	–	$0,38 \pm 0,26$	37	Kojadinovic <i>et al.</i> , 2006
Azores (Océano Atlántico)	0,031	2,4	–	29	Branco <i>et al.</i> , 2007
Ecuador (Océano Atlántico)	0,9	2,3	–	23	Branco <i>et al.</i> , 2007
Océano Índico	0,26	2,54	$1,47 \pm 0,63$	171	Chen <i>et al.</i> , 2007
Océano Atlántico	0,06	3,97	$1,20 \pm 1,12$	55	Chen <i>et al.</i> , 2007
Adquiridas en Taiwán	–	–	$3,64 \pm 0,15$	1	Chang <i>et al.</i> , 2007
Mercados chilenos	1,25	1,7	1,53	6	Cortes y Fortt, 2007
España	–	1,74	0,68	24	Blanco <i>et al.</i> , 2008
España	0,413	2,11	$0,958 \pm 0,475$	27	Este trabajo

### 5.3.2. Mercurio total y metilmercurio bioaccesible en pez espada

Las muestras de pez espada han sido sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro* y en la fracción bioaccesible se ha determinado Hg total y MeHg.

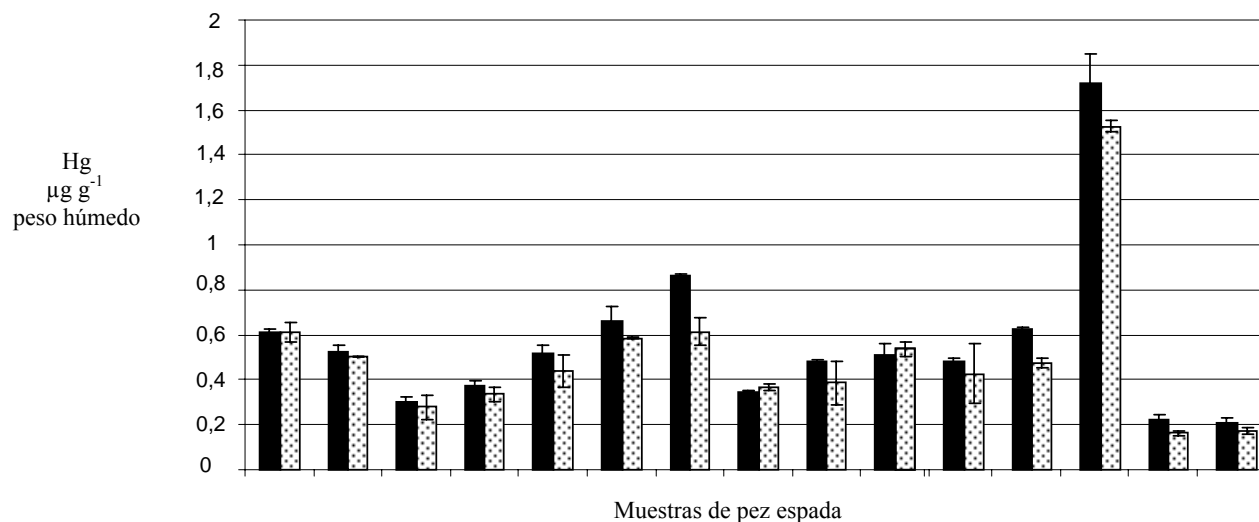
**Mercurio total bioaccesible.** Las concentraciones de Hg total bioaccesible (tabla 20) varían en un amplio rango: 0,166–1,72  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph (media  $\pm$  SD =  $0,633 \pm 0,398 \mu\text{g g}^{-1}$  ph). La bioaccesibilidad, porcentaje que relaciona la concentración de Hg bioaccesible con la concentración inicial de Hg en la muestra, varía entre el 38% y el 83%, (media  $\pm$  SD =  $64 \pm 14 \%$ ). No existe una relación proporcional entre la concentración de Hg en las muestras y su solubilidad gastrointestinal. Esto se pone de manifiesto en varias muestras, entre ellas la número 17 y la número 22, donde ante igualdad de concentraciones de Hg total en las muestras (1,18 y 1,20  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph, respectivamente) las concentraciones bioaccesibles son muy distintas (0,482 y 0,844  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph, respectivamente).

Dadas las adecuadas características analíticas de la metodología utilizada para cuantificar Hg total en la fracción bioaccesible, el amplio rango encontrado en los valores de bioaccesibilidad no puede ser atribuido a problemas del método analítico. Quizás las variaciones podrían ser consecuencia de las condiciones de almacenamiento que hayan sido aplicadas a cada una de las muestras desde su captura hasta su venta en el pequeño comercio. En ese sentido se ha evidenciado que la congelación produce cambios en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, cuya intensidad está influenciada por la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Este cambio podría afectar a la facilidad con que el tóxico

se solubiliza durante la digestión gastrointestinal. Con el objeto de comprobar si la congelación afectaba a la bioaccesibilidad, se evaluó dicho parámetro en porciones frescas y congeladas de una misma muestra. Los resultados no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de Hg bioaccesible. Dadas las implicaciones que para la seguridad alimentaria podrían extraerse de la bioaccesibilidad, sería de gran interés investigar qué otras variables (fisiológicas, nutricionales o de procesado) podrían correlacionarse significativamente con la bioaccesibilidad del Hg.

Los antecedentes sobre bioaccesibilidad de Hg en productos de la pesca son muy escasos. Los trabajos realizados analizan una única muestra de cada especie de pescado, por lo que no pueden evidenciarse diferencias en la bioaccesibilidad para una misma especie. Shim y colaboradores (2009) han obtenido valores de bioaccesibilidad en caballa (68%), dentro del intervalo aquí presentado para pez espada (38%-83%). Por el contrario Cabañero y colaboradores (2004) reportaron bioaccesibilidades muy inferiores en tres especies de productos de la pesca (17% en pez espada, 13% en sardina y 9% en atún) atribuyendo la baja bioaccesibilidad a una baja capacidad de las enzimas del método gastrointestinal *in vitro* para liberar el mercurio unido al selenio (Cabañero *et al.*, 2007). Sin embargo, las relaciones Se-Hg son muy distintas entre las tres muestras que analizan estos autores (2, 5 y 17 para pez espada, atún y sardina, respectivamente), no siendo tan amplias las variaciones en la bioaccesibilidad. En consecuencia, la hipótesis sobre el efecto de la relación Hg-Se en la bioaccesibilidad debería ser corroborada en posteriores estudios.

**Figura 8.** Concentraciones de mercurio total bioaccesible (■ Hg-t) y metilmercurio bioaccesible (▨ MeHg) en las fracciones solubles de peces espada comercializados en España



\* Valores expresados como media  $\pm$  SD (n = 3)

\* Las concentraciones de MeHg están expresadas como Hg

***Metilmercurio bioaccesible.*** La concentración de MeHg bioaccesible ha sido determinada en 15 de las muestras de pez espada (figura 8). Los valores oscilan entre 0,164 y 1,53  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph (media  $\pm$  SD =  $0,495 \pm 0,319 \mu\text{g g}^{-1}$  ph). En esta fracción soluble, el MeHg supone entre el 71% y el 105% del Hg total (media  $\pm$  SD =  $88 \pm 11\%$ ), evidenciando que el MeHg, especie de mayor toxicidad, es mayoritaria en el tracto gastrointestinal tras la ingesta de pez espada.

No tenemos conocimiento de la existencia de datos previos sobre concentraciones de MeHg bioaccesible. Únicamente Cabañero y colaboradores (2004, 2007) han reportado la relación entre el Se y el MeHg en la fracción bioaccesible de diferentes especies de pescado. Dichos datos, que vienen expresados como proporciones molares bioaccesibles [Se/Hg], muestran valores que oscilan entre 9,3 para el pez espada y 126,3 para sardina, sin aportar datos de concentraciones bioaccesibles de MeHg.



### **5.3.3. Evaluación del riesgo toxicológico en base a las concentraciones en el producto**

En España, los estudios que aportan datos de consumo para distintos productos de la pesca son muy escasos. Se puede citar el Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación (Varela *et al.*, 1995), que proporciona datos de consumo medio aparente de un alimento para la totalidad de la población encuestada. Este estudio indica un consumo medio de pez espada en adultos de 0,35 g/día, existiendo variaciones importantes entre Comunidades Autónomas, desde las no consumidoras hasta las de mayor consumo como Murcia (1,06 g/día) y Comunidad Valenciana (1,17 g/día). Más recientemente, el estudio del Consejo de Seguridad Nuclear (CSN, 2002) aportó nuevos datos respecto al consumo medio de pez espada para la totalidad de la población infantil (0,69 g/día) y adulta (1,5 g/día). El aspecto más interesante de este estudio es que aporta datos para los consumidores reales del producto, los cuales suponen un bajo porcentaje del total de los encuestados; sólo un 1,33% de los niños y un 2,55% de los adultos declararon consumir este producto. Para esta población, el consumo medio se eleva notablemente, alcanzando 52 g/día en los niños y 60 g/día en los adultos. El estudio del CSN también aporta otro dato muy relevante al indicar la cantidad ingerida por los consumidores extremos de pez espada: 112 g/día para niños y 102 g/día para adultos.

Los distintos datos de consumo aportados por el estudio del CSN van a ser utilizados en la evaluación del riesgo realizada en este capítulo de la tesis. Dichos datos de consumo se combinan con las concentraciones del tóxico halladas en las muestras analizadas [Hg total (tabla 20), Hg total

bioaccesible (tabla 20) y MeHg bioaccesible (figura 8)], y los resultados de ingesta del tóxico obtenidos se comparan con los valores de referencia toxicológicos propuestos por Organismos Internacionales.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) recomendaba hasta abril del año 2010 una Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) para Hg de 5  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/semana, de los cuales el MeHg no debía suponer más de 1,6  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/semana (WHO, 2003). Estos valores expresados como Ingesta Diaria Tolerable (IDT) suponían recomendaciones de ingesta de 0,71  $\mu\text{g Hg/kg}$  peso corporal y 0,23  $\mu\text{g MeHg/kg}$  peso corporal. Mucho más restrictiva es la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (U.S. EPA) que recomienda una ingesta diaria de MeHg de 0,1  $\mu\text{g/kg}$  peso corporal/día (U.S. EPA, 2001).

Recientemente, la 72<sup>a</sup> Conferencia del Comité de Expertos FAO/WHO (JECFA), ha modificado sus recomendaciones generando nuevas referencias para el control del riesgo asociado a la exposición a mercurio (WHO, 2010). Se ha eliminado la ISTP para el Hg total y las nuevas recomendaciones se establecen considerando la especiación: 4  $\mu\text{g}$  de Hg inorgánico/kg peso corporal/semana aplicable a la exposición dietética al Hg total procedente de alimentos diferentes a pescados y mariscos; 1,6  $\mu\text{g}$  de MeHg/kg peso corporal/semana para la exposición dietética a Hg a partir de pescados y mariscos. El Comité ha establecido estas recomendaciones suponiendo que la forma predominante de Hg en alimentos distintos a los pescados y mariscos es Hg inorgánico, aún admitiendo que los datos cuantitativos al respecto son insuficientes. Por lo que se refiere a MeHg, la comunidad

científica considera desde hace años que es la especie predominante en pescados y mariscos. Dada la escasa implementación en los laboratorios de control de metodologías analíticas para la especiación de mercurio, es de esperar que la nueva recomendación del Comité JECFA haga que las evaluaciones de riesgo se realicen asumiendo que la concentración de MeHg equivale a la concentración en Hg total.

En la presente tesis va a utilizarse un doble abordaje para la estimación del riesgo asociado a la presencia de Hg en pez espada. Por un lado se utilizará la IDT para Hg total establecida hasta abril de 2010 y por otro lado se utilizará la IDT para MeHg, que no ha sido modificada por la reciente reunión del Comité de Expertos.

*Estimación de la ingesta de Hg total.* La tabla 22 muestra las ingestas de Hg total estimadas para la población española y la evaluación del riesgo asociado a las mismas. Para los cálculos se han considerado las concentraciones mínima, media y máxima de Hg en las muestras (tabla 20).

Considerando el consumo medio de pez espada en la población infantil (0,69 g/día), la ingesta diaria de Hg no alcanzaría la IDT para ninguna de las concentraciones del tóxico halladas en el pescado, por lo que no existiría un riesgo. Sin embargo, si se estima la ingesta en los consumidores reales de pez espada, la situación es muy distinta. En los niños que realicen un consumo medio de este pescado (52 g/día), la ingesta de Hg total estaría muy próxima a la IDT o la superaría ampliamente, en función de las concentraciones de Hg en pez espada obtenidas. La situación se agravaría en los niños consumidores extremos (112 g/día) que superarían ampliamente la

IDT (entre 1,9 y 9,5 veces) para todas las concentraciones de Hg halladas en las muestras.

Los adultos se encontrarían ante una problemática similar. Para aquellos que realicen un consumo medio de pez espada (1,5 g/día), la ingesta podría suponer como máximo el 7% de la IDT. Por el contrario, en los consumidores reales del producto, tanto consumidores medios como extremos, la ingesta superaría la IDT para los pescados con concentraciones media y máxima de Hg total.

**Tabla 22.** Comparación de la ingesta diaria de Hg total estimada en pez espada para la población española con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS<sup>a</sup>

		Concentración de Hg en pez espada <sup>b</sup>			
		Mínima <sup>b</sup> 0,413 µg g <sup>-1</sup> ph	Media <sup>b</sup> 0,958 µg g <sup>-1</sup> ph	Máxima <sup>b</sup> 2,11 µg g <sup>-1</sup> ph	
		Ingesta Diaria Estimada			
<b>Niños</b>	<b>Toda la población</b>				
	Consumo medio <sup>c</sup>	0,69 g/día	1,14% de IDT	3% de IDT	6% de IDT
	<b>Sólo consumidores</b>				
	Consumo medio <sup>c</sup>	52 g/día	85% de IDT	x 2 IDT	x 4,4 IDT
	Consumo extremo <sup>c</sup>	112 g/día	x 1,9 IDT	x 4,3 IDT	x 9,5 IDT
<b>Adultos</b>	<b>Toda la población</b>				
	Consumo medio <sup>c</sup>	1,5 g/día	0,9% de IDT	3% de IDT	7% de IDT
	<b>Sólo consumidores</b>				
	Consumo medio <sup>c</sup>	60 g/día	51% de IDT	x 1,2 IDT	x 2,6 IDT
	Consumo extremo <sup>c</sup>	102 g/día	86% de IDT	x 2,0 IDT	x 4,4 IDT

<sup>a</sup> Recomendación de la OMS para Hg total: 5 µg Hg/kg peso corporal/semana (WHO, 2003). Para niños españoles de entre 7–12 años de edad, se considera un peso corporal de 34 kg, por lo que la IDT recomendada por la OMS se elevaría a 25 µg/día. Para adultos españoles, de ≥17 años de edad, se considera un peso corporal de 68 kg y la IDT recomendada por la OMS sería de 49 µg/día

<sup>b</sup> Concentraciones mínima, media y máxima de Hg en la totalidad de las muestras de pez espada analizadas en el presente estudio (tabla 20)

<sup>c</sup> Consumos de pez espada en la población española (CSN, 2002)

*Estimación de la ingesta de MeHg.* Para determinar la ingesta de MeHg, muchos estudios asumen que la totalidad del Hg existente en el pescado se encuentra como MeHg, lo cual supone una estimación conservadora para el consumidor. De igual forma se ha trabajado en el presente capítulo para estimar las ingestas de MeHg para la población española y la evaluación del riesgo asociado al consumo de pez espada (tabla 23).

Cuando se considera la totalidad de la población encuestada, ni el consumo medio realizado por los niños (0,69 g/día) ni el realizado por los adultos (1,5 g/día), da lugar a ingestas superiores a la IDT. Por el contrario, cuando se considera a los consumidores reales del producto, el consumo medio en niños (52 g/día) y adultos (60 g/día) lleva consigo ingestas de MeHg superiores a la IDT tanto en niños (hasta 13,6 veces la IDT) como en adultos (7,9 veces la IDT). La situación más preocupante aparecería en los consumidores extremos, niños y adultos, que llegan a ingerir una cantidad de MeHg 29,6 y 13,5 veces superior al valor recomendado, respectivamente.

**Tabla 23.** Comparación de la ingesta diaria de MeHg estimada en pez espada para la población española con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) recomendada por la OMS<sup>a</sup>

			Concentración de Hg en pez espada <sup>b</sup>		
			Mínima <sup>b</sup> 0,413 µg g <sup>-1</sup> ph	Media <sup>b</sup> 0,958 µg g <sup>-1</sup> ph	Máxima <sup>b</sup> 2,11 µg g <sup>-1</sup> ph
			Ingesta Diaria Estimada		
Niños	Toda la población				
	Consumo medio <sup>c</sup>	0,69 g/día	4% de IDT	8% de IDT	18% de IDT
	Sólo consumidores				
	Consumo medio <sup>c</sup>	52 g/día	x 2,7 IDT	x 6,2 IDT	x 13,6 IDT
	Consumo extremo <sup>c</sup>	112 g/día	x 5,8 IDT	x 13,5 IDT	x 29,6 IDT
Adultos	Toda la población				
	Consumo medio <sup>c</sup>	1,5 g/día	4% de IDT	9% de IDT	20% de IDT
	Sólo consumidores				
	Consumo medio <sup>c</sup>	60 g/día	x 1,6 IDT	x 3,6 IDT	x 7,9 IDT
	Consumo extremo <sup>c</sup>	102 g/día	x 2,6 IDT	x 6,1 IDT	x 13,5 IDT

<sup>a</sup> Recomendación de la OMS para MeHg: = 1,6 µg MeHg/kg peso corporal/semana (WHO, 2010). Para niños españoles de entre 7–12 años de edad, el peso corporal es de 34 kg; para este peso la IDT recomendada por la OMS es de 8 µg/día. Para adultos españoles, de ≥17 años de edad, el peso corporal es de 68 kg; para este peso la IDT recomendada por la OMS es de 16 µg/día

<sup>b</sup> Concentraciones mínima, media y máxima de mercurio para la totalidad de las muestras de pez espada analizadas en el presente estudio (tabla 20). Se ha asumido que la totalidad del Hg en el pez espada está presente en forma de MeHg

<sup>c</sup> Consumos de pez espada en la población española (CSN, 2002)

Los resultados expuestos indican que existe población española infantil y adulta consumidora de pez espada que se encuentra en riesgo por exposición a MeHg a través de este producto. Este hecho se produce aún cuando el pez espada tenga una concentración de Hg inferior al límite máximo legislado ( $1 \mu\text{g g}^{-1}$  ph). Ello debería llevar a las autoridades sanitarias a realizar recomendaciones de consumo máximo del producto para niños y adultos. Dado el carácter neurotóxico del MeHg y su transmisión a través de la placenta y de la leche materna, algunos países han adoptado recomendaciones para grupos de riesgo: mujeres que pueden quedarse embarazadas, mujeres embarazadas, madres lactantes, y niños pequeños. Este es el caso del Reino Unido, donde la Agencia de Estándares Alimentarios (FSA) recomienda que los niños y las embarazadas no consuman pez espada y que las mujeres lactantes no consuman más de una ración a la semana (FSA, 2008). Otro ejemplo es Canadá, donde se recomienda el consumo máximo de 150 g/mes de pez espada para las mujeres embarazadas y para las madres lactantes, de 125 g/mes para niños de entre 5-11 años de edad y de 75 g/mes para niños de entre 1-4 años de edad (Health Canada, 2008). En España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha establecido recomendaciones muy superiores a las anteriormente citadas, ya que limita a 100 g/semana el consumo de estas especies en mujeres embarazadas, en fase de lactancia y niños menores de 30 meses (AESAN, 2008).

En base a los datos obtenidos en esta investigación es posible realizar una estimación de un consumo de pez espada que dé lugar a ingestas seguras de MeHg. Como muestra la tabla 24, incluso en el caso en que todo el Hg se hallara en forma de MeHg, un consumo de 25 g de pez espada/semana para



la población infantil española y de 50 g/semana para la población adulta daría lugar a ingestas de MeHg inferiores a la ISTP recomendada por la OMS. Aún cuando la concentración media de Hg hallada en los pescados ( $0,958 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ph}$ ) esté muy próxima al valor máximo permitido por la legislación ( $1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ph}$ ), el consumo de estas cantidades no representaría un riesgo para la salud. Estos consumos son similares a los recomendados por Canadá, pero inferiores a la actual recomendación de la AESAN (100 g/semana).

**Tabla 24.** Consumo semanal de pez espada para la población española que proporcionaría ingestas de MeHg inferiores a la Ingesta Semanal Tolerable Provisional recomendada por la OMS<sup>a</sup>

<b>Niños</b> (ISTP de MeHg para población infantil: 55 µg/semana)	
<b>Consumo propuesto: 25 g pez espada/semana</b>	
Concentración de Hg en pez espada <sup>b</sup>	Ingesta Semanal estimada de MeHg <sup>c</sup>
Mínima: 0,413 µg g <sup>-1</sup> ph	10 µg MeHg/semana
Media: 0,958 µg g <sup>-1</sup> ph	24 µg MeHg /semana
Máxima: 2,11 µg g <sup>-1</sup> ph	53 µg MeHg /semana
<b>Adultos</b> (ISTP de MeHg para población adulta: 110 µg/semana)	
<b>Consumo propuesto: 50 g pez espada/semana</b>	
Concentración de Hg en pez espada <sup>b</sup>	Ingesta Semanal estimada de MeHg <sup>c</sup>
Mínima: 0,413 µg g <sup>-1</sup> ph	21 µg MeHg/semana
Media: 0,958 µg g <sup>-1</sup> ph	48 µg MeHg /semana
Máxima: 2,11 µg g <sup>-1</sup> ph	106 µg MeHg /semana

<sup>a</sup> Recomendación de la OMS para MeHg: 1,6 µg Hg/kg peso corporal/semana (WHO, 2010). Para niños españoles de entre 7–12 años de edad, el peso corporal es de 34 kg; para este peso la ISTP recomendada por la OMS es de 55 µg/semana. Para adultos españoles, de ≥17 años de edad, el peso corporal es de 68 kg; para este peso la ISTP recomendada por la OMS es de 110 µg/semana

<sup>b</sup> Concentraciones mínima, media y máxima de Hg halladas en las muestras de pez espada (tabla 20). Se ha asumido que todo el Hg en el pez espada está presente en forma de MeHg

<sup>c</sup> Ingestas calculadas considerando el consumo propuesto y las concentraciones de MeHg indicadas

#### **5.3.4. Evaluación del riesgo toxicológico en base a las concentraciones bioaccesibles**

Las concentraciones de MeHg bioaccesible halladas en el presente trabajo oscilan entre 0,164 y 1,53  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph (valor medio = 0,495  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph) (figura 8). En la población infantil consumidora de pez espada (consumo 52 g/día), las ingestas diarias de MeHg estimadas a partir de las concentraciones bioaccesibles oscilarían entre 8 y 79  $\mu\text{g MeHg/día}$  (valor medio = 32  $\mu\text{g MeHg/día}$ ), excediendo entre 1 y 10 veces la IDT recomendada por la OMS (media = 3,2 veces la IDT). Para la población adulta consumidora de pez espada (consumo 60 g/día), las ingestas diarias estimadas de MeHg oscilarían entre 10 y 92  $\mu\text{g MeHg/día}$  (valor medio = 38  $\mu\text{g MeHg/día}$ ), valores que representarían entre un 63% de la IDT y 6 veces la IDT (media = 1,9 veces la IDT).

Estos resultados muestran que seguiría existiendo una situación de riesgo al considerar las concentraciones de MeHg bioaccesible en vez de las concentraciones en el producto. No obstante, las ingestas diarias estimadas son 2,5 veces inferiores a las obtenidas a partir de pez espada crudo.

## **5.4. Bioaccesibilidad de mercurio en peces depredadores crudos y cocinados comercializados en España**

*Los productos de la pesca constituyen la principal vía de exposición al mercurio. Entre los distintos pescados y mariscos, son los peces depredadores que ocupan los niveles más altos de la cadena trófica, como pez espada, tiburón y atún los que presentan las mayores concentraciones de mercurio.*

*En los últimos años se han detectado numerosas alertas alimentarias por altas concentraciones de mercurio en peces depredadores, correspondiendo muchas de ellas a pescados comercializados en España. Las implicaciones que para el consumidor puede tener el consumo de productos que exceden los límites permitidos deberían ser objeto de mayores estudios. Estas investigaciones deberían considerar adicionalmente, el efecto que el cocinado y la digestión gastrointestinal pueden ejercer sobre la concentración de mercurio que puede ser absorbida. El presente capítulo de tesis analiza el efecto de ambos factores (cocinado y bioaccesibilidad) sobre el riesgo toxicológico asociado al consumo de peces depredadores comercializados en España. En las páginas siguientes se muestran los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.*

Se ha determinado la concentración de Hg en cuatro especies depredadoras de pescado de consumo habitual en España: pez espada fresco y congelado (*Xiphias gladius*) ( $n = 7$ ), cazón congelado (*Galeorhinus galeus*) ( $n = 7$ ), bonito congelado (*Sarda* sp.) ( $n = 7$ ) y atún fresco (*Thunnus* sp.) ( $n = 7$ ). Las muestras fueron adquiridas en los comercios de mayor volumen de ventas de la ciudad de Valencia (Comunidad Valenciana, España), tanto en grandes superficies como en el Mercado Central, el mayor mercado de venta al por menor de la ciudad. Las muestras frescas se adquirieron en distintos días durante su época de pesca y comercialización, mientras que las muestras congeladas se pudieron adquirir durante todo el año. Las muestras de pez espada corresponden a individuos diferentes a los analizados en el capítulo 5.3 de la presente tesis.

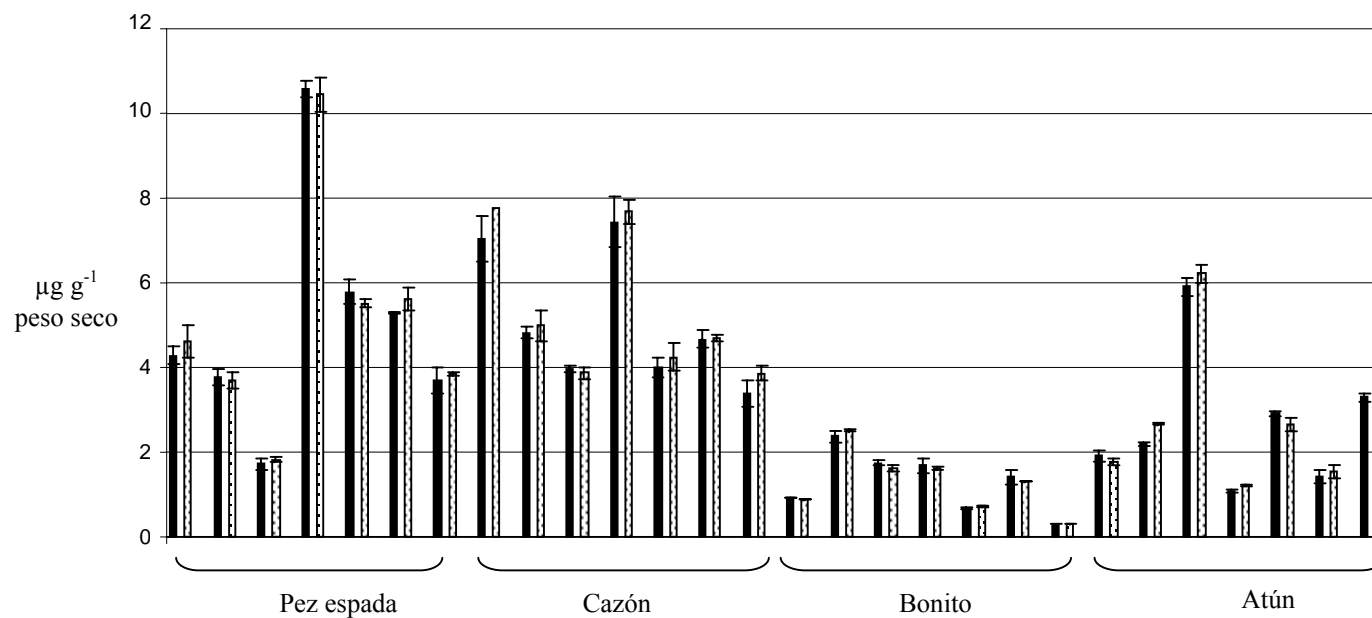
Las rodajas de una misma especie fueron adquiridas en distintos comercios y en distintos días de compra, de forma que en ninguno de los casos las rodajas pertenecieron a un mismo ejemplar. El tamaño de las rodajas fue variable según la especie de pescado considerada. Se utilizaron rodajas con un peso en torno a los 250 g para pez espada, bonito y atún, y de aproximadamente 150 g para cazón. El tamaño de estas rodajas permitió su división en dos porciones iguales. Una de las porciones se empleó para el análisis en crudo mientras que la otra porción fue cocinada sin la adición de ingredientes adicionales. Para el proceso de cocinado se colocó el producto sobre una superficie de acero inoxidable (1 cm grosor), calentada directamente sobre una llama de gas. La temperatura en la placa fue de 100 °C y ésta fue también la temperatura que alcanzó el interior del producto al final del tratamiento. El tiempo de cocinado fue el necesario para asegurar

que el producto no quedara crudo y fuera apto para su consumo. Esta forma de cocinado a la plancha es de uso frecuente en España para el consumo de los pescados analizados en este trabajo.

#### **5.4.1. Mercurio total en pescado crudo y cocinado**

La figura 9 muestra las concentraciones de Hg total halladas en las muestras crudas y cocinadas expresadas en peso seco (ps). Al comparar los resultados en peso seco, se elimina el efecto del incremento de la concentración de Hg debido a la pérdida de agua. El análisis estadístico de los resultados [modelo mixto de medidas repetidas estado\*especie de pescado, factores fijos estado y especie de pescado, modelo factorial cruzado], indica que tanto el efecto del “cocinado” como el efecto de la interacción “cocinado\*especie de pescado” no son significativos ( $p < 0,05$ ). En consecuencia, para las cuatro especies de pescado analizadas no se producen pérdidas ni ganancias de mercurio durante el cocinado.

**Figura 9.** Concentraciones de Hg total ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) en peces depredadores españoles crudos (■) y cocinados (▨)



\* Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=3)

Cuando los resultados de Hg se expresan en peso húmedo, se observa que tras el cocinado las concentraciones se incrementan entre un 8% y un 93% (incremento medio =  $30\% \pm 19$ ). Los mayores incrementos medios tienen lugar en pez espada (43%) y atún (32%), siendo menores en cazón (22%) y bonito (20%). Para la totalidad de las muestras analizadas, la pérdida media de peso tras el cocinado (crudo/cocinado = 1,3) es igual al incremento de la concentración de Hg tras el cocinado (cocinado/crudo = 1,3), indicando que la pérdida de agua durante el cocinado es la causa principal del incremento en la concentración de Hg observada.

En la bibliografía existen estudios que han puesto de manifiesto que la mayoría de combinaciones tratamiento de cocinado-pescado producen un incremento significativo de la concentración de Hg, en un factor que oscila entre 1,1 y 1,8 (Morgan *et al.*, 1997; Burger *et al.*, 2003, Perelló *et al.*, 2008). Por ello, parecería conveniente asumir un factor de conversión crudo-cocinado en la estimación de riesgos a partir de las concentraciones de Hg en pescado cocinado, que podría situarse en torno a 2. No obstante, cada país debería calcular estos factores teniendo en cuenta las especies de pescado que consume su población y los hábitos de cocinado locales. Actualmente, la legislación europea sobre contaminantes en productos alimenticios ya contempla que al evaluar las concentraciones de Hg con fines de control, se consideren los cambios de concentración provocados por los procesos de secado, dilución y de transformación utilizados por las industrias (EC, 2006). Trasladar esta consideración al efecto del cocinado en la evaluación de riesgos, quizás debería ser contemplado por las Agencias de Seguridad Alimentaria.



Por lo que respecta a las concentraciones de Hg halladas en el presente trabajo, éstas oscilan entre 0,102 y 2,16  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso húmedo (ph). Un elevado porcentaje de las muestras analizadas (39%) excede el límite máximo permitido por la legislación europea de obligatorio cumplimiento en España (1  $\mu\text{g g}^{-1}\text{ph}$ ) (EC, 2008). Estos datos revelan que a pesar de las medidas de control sanitario, el porcentaje de productos en el mercado no considerados aptos para su consumo es elevado. La situación de riesgo no es nueva, ya que estos peces depredadores son causa permanente de problemas de seguridad alimentaria. Así, entre los años 2007 y 2009 la UE emitió 119 alertas totales por exceso de Hg en productos de la pesca, correspondiendo el 62% a pescado español o comercializado a través de España (RASFF, 2010).

Concentraciones similares a las obtenidas en el presente trabajo han sido reportadas anteriormente para peces depredadores comercializados en España. En pez espada crudo, el rango de concentraciones hallado (0,437-2,16  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph) se solapa con los valores reportados en la literatura para muestras de esta especie de pescado comercializadas en España: 0,42-2,22  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph;  $n = 92$  (Cabañero *et al.*, 2004; Falcó *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2008; Herreros *et al.*, 2008). En cazón crudo, una especie de tiburón, las concentraciones de Hg halladas (0,866-1,39  $\mu\text{g g}^{-1}\text{ph}$ ) se encuentran dentro del intervalo reportado en la bibliografía para carne de tiburón comercializada en España (0,549-1,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph;  $n = 14$ ) (Bordajandi *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2008). En bonito crudo, las concentraciones de Hg halladas (0,102-0,691  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph) son las más bajas de todas las especies analizadas en el presente trabajo, no habiéndose encontrado en la literatura, datos previos sobre Hg en bonito crudo comercializado en España.

Finalmente, por lo que respecta al atún crudo, el rango de concentraciones obtenido ( $0,433\text{--}1,471\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$ ) se encuentra dentro del rango de valores reportados en la bibliografía para muestras de atún fresco comercializadas en España:  $0,02\text{--}2,5\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$ ;  $n = 33$  (Bordajandi *et al.*, 2004; Cabañero *et al.*, 2004; Falcó *et al.*, 2006; Perelló *et al.*, 2008; Yusà *et al.*, 2008).

En pescados cocinados, las concentraciones de Hg halladas en el presente trabajo son las siguientes:  $0,564\text{--}4,19\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$  para pez espada;  $1,071\text{--}1,76\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$  para cazón;  $0,110\text{--}0,820\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$  para bonito;  $0,535\text{--}1,85\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$  para atún. Únicamente Perelló y colaboradores (2008) han analizado especies de pescado cocinadas comunes a las de este estudio, hallando en muestras de atún frito y asado concentraciones de  $0,421$  y  $0,369\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$  de Hg, respectivamente.

#### 5.4.2. Mercurio bioaccesible en pescado crudo y cocinado

Para estimar la bioaccesibilidad del Hg en pescado crudo y cocinado, las muestras fueron sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*. La tabla 25 muestra las concentraciones de Hg total, Hg bioaccesible y la bioaccesibilidad del Hg halladas en tres muestras individuales de cada especie de pescado.

En las muestras crudas, las concentraciones de Hg bioaccesible oscilan entre  $0,067$  y  $1,13\ \mu\text{g g}^{-1}\text{ ph}$  y la bioaccesibilidad entre  $13\%$  y  $87\%$  (valor medio =  $42 \pm 26\%$ ). En la bibliografía, los datos de bioaccesibilidad del Hg en muestras de pescado crudo son muy escasos e inferiores a los datos obtenidos en el presente estudio. Al margen de los datos comentados en el

capítulo anterior de esta tesis doctoral [bioaccesibilidad media de mercurio para pez espada = 83% ( $1,72 \mu\text{g g}^{-1} \text{ph}$ )], únicamente existe un estudio en atún crudo (Cabañero *et al.*, 2004), en el que la concentración de Hg bioaccesible ( $0,106 \mu\text{g g}^{-1} \text{ph}$ ) supone una bioaccesibilidad del 9%. No tenemos conocimiento de ninguna investigación previa realizada en cazón o bonito crudos.

En pescado cocinado, la concentración de Hg bioaccesible oscila entre  $0,063$  y  $0,851 \mu\text{g g}^{-1} \text{ph}$ . Para pez espada y atún cocinados existe un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones de Hg bioaccesible respecto a las halladas en los pescados crudos. Los cambios no son significativos ( $p < 0,05$ ) para cazón y bonito cocinados.

La bioaccesibilidad, que expresa en forma de porcentaje la cantidad de Hg solubilizada tras la digestión *in vitro*, pone también de manifiesto claras diferencias de comportamiento entre pescado crudo y cocinado (tabla 25). En el pescado cocinado la bioaccesibilidad de Hg oscila entre 6% y 49% (valor medio = 26%), frente al 13% y 87% de muestras crudas (valor medio = 42%). El descenso de la bioaccesibilidad es mayor en pez espada (crudo/cocinado = 1,8) y atún (crudo/cocinado = 1,9), que en cazón (crudo/cocinado = 1,5) y bonito (crudo/cocinado = 1,4). Estos cambios en la bioaccesibilidad entre pescados crudos y cocinados deberían ser considerados en la evaluación de riesgos. Veamos un ejemplo considerando los resultados obtenidos en la muestra 1 de pez espada crudo (tabla 25); si se utiliza el 87% de bioaccesibilidad hallado en la muestra cruda para evaluar la concentración de Hg bioaccesible en pescado cocinado, el resultado teórico ( $1,50 \mu\text{g g}^{-1} \text{ph}$ ) es muy superior al obtenido experimentalmente

(0,851  $\mu\text{g g}^{-1}$  ph). Esto evidencia que la extrapolación de valores medios de bioaccesibilidad en pescado crudo para estimar las concentraciones bioaccesibles de Hg en pescado cocinado podría dar lugar a una sobreestimación de la concentración bioaccesible y por ende del riesgo.

El cambio en la bioaccesibilidad tras el cocinado podría ser atribuible a alteraciones en la conformación estructural de las proteínas del músculo del pescado producidas por la temperatura, lo que podría causar la pérdida de la estructura nativa de las proteínas. Estos cambios podrían dificultar el acceso de las enzimas empleadas en la digestión gastrointestinal *in vitro* a las moléculas a las que se une el Hg, preferentemente los grupos sulfhidrilo presentes en moléculas como la cisteína (Rooney, 2007). Para otros elementos traza tóxicos en pescados, existen estudios que ponen de manifiesto los efectos del cocinado en la bioaccesibilidad. Por ejemplo, el cocinado (hervido en agua salada) del gasterópodo *Buccinum undatum* no afecta a la bioaccesibilidad de la plata, pero decrece significativamente la bioaccesibilidad de cadmio, plomo, cobre y zinc (Amiard *et al.*, 2008). También se ha reportado en mejillones cocinados un descenso en la bioaccesibilidad de cadmio, selenio y zinc respecto al producto crudo (Metian *et al.*, 2009).

Como se ha comentado en la introducción de la presente tesis, las concentraciones de Hg bioaccesible son indicativas de la máxima biodisponibilidad oral, y por ende de la máxima concentración del tóxico al que podría estar expuesto el organismo humano. Por ello, la bioaccesibilidad quizá podría ser utilizada con fines legislativos, limitándose la concentración máxima bioaccesible en el producto cocinado

en vez de la concentración máxima en el producto crudo. No obstante, a efectos prácticos esto plantearía dos inconvenientes. Por un lado, los procedimientos de cocinado son muy diversos y variable su influencia sobre la concentración del tóxico. Por otro lado, el análisis de bioaccesibilidad podría ser considerado excesivamente tedioso para el análisis de rutina que realizan los organismos de vigilancia. Frente a estas consideraciones, una alternativa podría ser el empleo de factores de corrección sobre la cantidad de Hg u otros contaminantes presentes en los productos crudos, que tuvieran en cuenta los cambios de concentración del tóxico producidos por el cocinado y por la digestión gastrointestinal. Para definir estos factores deberían realizarse un mayor número de investigaciones.

**Tabla 25.** Concentraciones de Hg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ph), Hg bioaccesible ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ph) y bioaccesibilidad del Hg (%) en peces depredadores españoles crudos y cocinados

		Pescado crudo			Pescado cocinado		
Muestra		Hg <sup>a</sup>	Hg bioaccesible <sup>a</sup>	Bioaccesibilidad <sup>b</sup>	Hg <sup>a</sup>	Hg Bioaccesible <sup>a</sup>	Bioaccesibilidad <sup>b</sup>
Pez espada	1	1,30 ± 0,09	1,13 ± 0,04	87	1,73 ± 0,16	0,851 ± 0,083	49
	2	1,11 ± 0,04	0,803 ± 0,004	72	1,50 ± 0,06	0,519 ± 0,042	35
	3	1,37 ± 0,01	0,815 ± 0,060	59	1,89 ± 0,09	0,713 ± 0,071	38
Cazón	4	1,40 ± 0,02	0,960 ± 0,048	69	1,76 ± 0,13	0,819 ± 0,015	47
	5	0,941 ± 0,027	0,404 ± 0,012	43	1,07 ± 0,08	0,369 ± 0,001	34
	6	1,04 ± 0,02	0,617 ± 0,051	59	1,17 ± 0,04	0,416 ± 0,026	36
Bonito	7	0,691 ± 0,039	0,150 ± 0,008	22	0,820 ± 0,007	0,130 ± 0,009	16
	8	0,396 ± 0,029	0,067 ± 0,009	17	0,524 ± 0,026	0,064 ± 0,005	12
	9	0,456 ± 0,010	0,106 ± 0,013	23	0,540 ± 0,012	0,090 ± 0,008	17
Atún	10	0,600 ± 0,023	0,115 ± 0,008	19	0,670 ± 0,026	0,066 ± 0,008	10
	11	1,47 ± 0,05	0,222 ± 0,029	15	1,85 ± 0,06	0,183 ± 0,012	10
	12	0,743 ± 0,016	0,095 ± 0,010	13	0,987 ± 0,057	0,063 ± 0,004	6

<sup>a</sup> Valores expresados como media ± SD (n=3)

<sup>b</sup> Bioaccesibilidad = [(Hg en la fracción bioaccesible del pescado) x 100]/(Hg en pescado)

### 5.4.3. Evaluación del riesgo toxicológico

Para evaluar el riesgo toxicológico asociado al consumo de los peces depredadores analizados, se han utilizado los datos de consumo (g/día) para pez espada, bonito y atún de los consumidores españoles reales, tanto niños (7–12 años de edad) como adultos ( $\geq 17$  años de edad) proporcionados por el estudio del CSN (CSN, 2002).

A partir de los datos de consumo y de las concentraciones medias de Hg presentes en los pescados crudos, cocinados y en la fracción bioaccesible de los mismos (tabla 25), se han calculado las ingestas diarias para niños y adultos (tabla 26). Para ello se ha asumido que todo el Hg presente en las muestras analizadas se halla en forma de MeHg, lo cual supone una estimación conservadora para el consumidor. Las ingestas diarias para cada tipo de pescado se han comparado con la IDT para MeHg (0,71  $\mu\text{g/kg/peso corporal}$ ) (WHO, 2010).

Si para el cálculo de las ingestas se utilizan las concentraciones en pescados crudos y cocinados, los valores obtenidos para todos los tipos de pescados analizados exceden, tanto en la población infantil como adulta, los valores de IDT establecidos por la FAO/OMS (tabla 26). Sin embargo, si las estimaciones se basan en las concentraciones bioaccesibles en pescados cocinados, las ingestas de bonito y atún no representan un riesgo para la salud, mientras que se continúa excediendo la IDT para pez espada.

No se dispone de datos de consumo de cazón. El empleo de valores medios de consumo de pescado para la población española (71 g/día para adultos y 46 g/día para niños; CSN, 2002) podría dar lugar a una

sobreestimación del riesgo asociado a este pescado. Sin embargo, teniendo en cuenta las altas concentraciones en cazón crudo y cocinado, similares a las encontradas en pez espada crudo y cocinado, sería probable que existiera una situación de alto riesgo para los consumidores frecuentes o extremos de este pescado.

Tal y como se ha puesto de manifiesto mediante las muestras analizadas, tanto el cocinado como la bioaccesibilidad son factores que deberían ser considerados en un futuro en la evaluación del riesgo asociado a la presencia de Hg en peces depredadores comercializados en España.



**Tabla 26.** Estimación de ingestas diarias de Hg a partir del consumo de pez espada, bonito y atún y comparación con las Ingestas Diarias Tolerables recomendadas por la OMS<sup>a</sup>

		<b>Pescado crudo</b>	<b>Pescado cocinado</b>	<b>Bioaccesible cocinado</b>
<b>Pez espada</b>	Concentración media de Hg <sup>b</sup>	1,26 µg g <sup>-1</sup> ph	1,71 µg g <sup>-1</sup> ph	0,694 µg g <sup>-1</sup> ph
	Ingesta infantil (consumo de 52 g/día <sup>c</sup> )	x 8,3 IDT	x 11,2 IDT	x 4,5 IDT
	Ingesta de adultos (consumo de 60 g/día <sup>c</sup> )	x 4,9 IDT	x 6,6 IDT	x 2,7 IDT
<b>Bonito</b>	Concentración media de Hg <sup>b</sup>	0,514 µg g <sup>-1</sup> ph	0,628 µg g <sup>-1</sup> ph	0,094 µg g <sup>-1</sup> ph
	Ingesta infantil (consumo de 44 g/día <sup>c</sup> )	x 2,8 IDT	x 3,5 IDT	52% de IDT
	Ingesta de adultos (consumo de 36 g/día <sup>c</sup> )	x 1,2 IDT	x 1,4 IDT	22% de IDT
<b>Atún</b>	Concentración media de Hg <sup>b</sup>	0,938 µg g <sup>-1</sup> ph	1,17 µg g <sup>-1</sup> ph	0,114 µg g <sup>-1</sup> ph
	Ingesta infantil (consumo de 29 g/día <sup>c</sup> )	x 3,5 IDT	x 4,3 IDT	42% de IDT
	Ingesta de adultos (consumo de 34 g/día <sup>c</sup> )	x 2,1 IDT	x 2,6 IDT	25% de IDT

<sup>a</sup> La Ingesta Semanal Tolerable Provisional para MeHg [1,6 µg MeHg/kg peso corporal/semana (WHO, 2010)] es equivalente a una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 0,71 µg Hg/kg peso corporal. Para los pesos medios de la población infantil (7–12 años; 34 kg) y la población adulta (68 kg) en España (CSN, 2002), los valores de la IDT son 25 µg/día y 49 µg/día, respectivamente

<sup>b</sup> Se ha asumido que todo el Hg está presente en forma de MeHg. Resultados expresados en peso húmedo (ph)

<sup>c</sup> Consumo medio de especies depredadoras de pescado en consumidores reales, niños y adultos, de la población española (CSN, 2002)

### **5.5. Comparación de un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* estático y el modelo dinámico TIM-1 para estimar la bioaccesibilidad del arsénico, cadmio, plomo y mercurio en los materiales de referencia de alimentos *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) y hepatopáncreas de langosta (TORT-2)**

*Para el estudio de la bioaccesibilidad de los elementos traza tóxicos se pueden emplear modelos estáticos y dinámicos que simulan las condiciones fisiológicas humanas. El presente capítulo compara la bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en dos materiales de referencia certificados de alimentos, empleando un método de digestión gastrointestinal *in vitro* estático y un método dinámico multicompartimental (TIM-1).*

*Adicionalmente y dada la dificultad de acceso a la aplicación de la metodología TIM, se decidió obtener una mayor información sobre la bioaccesibilidad de otros elementos tóxicos en estos MRCs. Por ello, se determinó la bioaccesibilidad de Cd y Pb, tóxicos alimentarios que son objeto de control por la mayoría de las legislaciones alimentarias.*

*Con este propósito se analizó el alga *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) y el hepatopáncreas de langosta (TORT-2). Los aspectos relativos a materiales y métodos correspondientes a este estudio se han descrito en los capítulos anteriores de la presente tesis. En las páginas siguientes se muestran los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.*

Se han aplicado dos métodos de digestión gastrointestinal *in vitro* [un método estático (ME) y un método dinámico multicompartimental (TIM-1)] a dos materiales de referencia certificados de alimentos. De entre los MRCs disponibles en el mercado, los productos marinos presentan concentraciones de As, Cd, Pb y Hg superiores a las existentes en materiales de origen terrestre. Por esta razón, en el presente trabajo se han seleccionado una muestra certificada de alga [*Fucus* sp. (IAEA-140/TM)] y otra muestra de marisco [hepatopáncreas de langosta (TORT-2)]. Ambas muestras certifican una concentración de As, Cd, Pb y Hg superior a la descrita en otros materiales de referencia de origen marino.

Cada uno de los métodos de digestión gastrointestinal ha sido aplicado por duplicado a las muestras. Se han utilizado los procedimientos tal y como se han descrito en el capítulo de métodos. La tabla 27 muestra un resumen de las condiciones empleadas.

En las fracciones bioaccesibles resultantes de cada una de las réplicas de la digestión gastrointestinal se determinan por triplicado las concentraciones de As (mineralización seca-FI-HG-AAS), Cd (digestión por microondas-GF-AAS), Pb (digestión por microondas-GF-AAS) y Hg (digestión por microondas-CV-AFS). No se llevaron a cabo estudios de especiación en las fracciones bioaccesibles.

**Tabla 27.** Resumen de las condiciones empleadas en los métodos de digestión gastrointestinal *in vitro* estático (ME) y dinámico (TIM-1)

	Digestión por ME	Digestión por TIM-1
Concentración de matriz en el fluido digestivo simulado	20 g L <sup>-1</sup>	17 g L <sup>-1</sup>
Tipo de modelo	Gastrointestinal estático	Gastrointestinal dinámico
Tª de incubación	37 °C	37 °C
Agitación	120 órbitas min <sup>-1</sup>	Mezclado del quimo
<b>Digestion gástrica</b>		
Volumen	100 mL	250 mL
pH	2	tiempo = 0 min    pH = 6,4 tiempo = 15 min    pH = 5,7 tiempo = 45 min    pH = 4,5 tiempo = 90 min    pH = 2,9 tiempo = 120 min    pH = 2,3 tiempo = 300 min    pH = 1,7
Tiempo de incubación	2 h	Parámetros de vaciado gástrico*: $t_{1/2} = 85 \text{ min}$ $\beta = 1,8$
Enzimas gástricas	Pepsina	Lipasa, pepsina
<b>Digestión intestinal</b>		
Volumen	100 mL	170 mL (30 mL en el duodeno y 70 mL en el yeyuno e íleo)
pH	5	6,4 (duodeno); 6,9 (yeyuno); 7,2 (íleo)
Tiempo de incubación	2 h	Parámetros de vaciado ileal*: $t_{1/2} = 250 \text{ min}$ $\beta = 2,5$ Duración total de digestión: 6 h
Extracto biliar	Porcino	Porcino
Enzimas intestinales	Pancreatina	Pancreatina
Centrifugación	sí	sí
Filtración	Sí. 11 µm	Sí. 11 µm
Determinación analítica	Mineralización seca FI-HG-AAS (As) Microondas GF-AAS (Cd, Pb) Microondas CV-AFS (Hg)	Mineralización seca FI-HG-AAS (As) Microondas GF-AAS (Cd, Pb) Microondas CV-AFS (Hg)

\* Para controlar el tránsito del quimo, se emplea una fórmula exponencial de los vaciados gástricos e ileales ( $f = 1 - 2^{-(t/1/2)^\beta}$ , donde  $f$  representa la fracción de vaciado del quimo,  $t$  el tiempo de vaciado,  $t^{1/2}$  la vida media de vaciado, y  $\beta$  es un coeficiente que describe la forma de la curva) (Minekus *et al.*, 1995).

La tabla 28 muestra los resultados obtenidos para ambos materiales de referencia y para ambos métodos de digestión gastrointestinal: concentraciones certificadas de As, Cd, Pb y Hg, concentraciones halladas en las muestras, y concentraciones halladas en las fracciones bioaccessibles. Asimismo, se indica la bioaccesibilidad y la relación entre las bioaccesibilidades obtenidas mediante los métodos de digestión *in vitro* estático y TIM-1.

**Tabla 28.** Resultados del estudio de bioaccesibilidad en MRCs de alimentos tras la aplicación de los modelos de digestión estático (ME) y dinámico (TIM-1). Concentraciones de As, Cd, Pb y Hg en las muestras y en sus fracciones bioaccesibles, bioaccesibilidad BA (%) y relación de bioaccesibilidades ME/TIM-1

Elemento	Muestra	Concentración certificada ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps)	Concentración hallada <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps)	Digestión por ME		Digestión por TIM-1		ME/TIM-1 <sup>d</sup>
				Concentración bioaccesible <sup>b</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps)	BA <sup>c</sup> (%)	Concentración bioaccesible <sup>b</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ps)	BA <sup>c</sup> (%)	
As	<i>Fucus</i> sp.	42,2 -46,4	43,3 $\pm$ 0,5	31,0 (28,4-33,6)	72	20,3 (18,5-21,8)	47	1,5
	TORT-2	21,6 $\pm$ 1,8	21,3 $\pm$ 0,4	15,1 (14,5-15,7)	71	14,3 (12,4-16,2)	67	1,1
Cd	<i>Fucus</i> sp.	0,500 -0,574	0,520 $\pm$ 0,024	0,061 (0,042-0,074)	12	0,180 (0,140-0,220)	35	0,3
	TORT-2	26,7 $\pm$ 0,6	26,6 $\pm$ 0,5	5,48 (4,90-6,4)	21	14,2 (12,50-15,90)	53	0,4
Pb	<i>Fucus</i> sp.	1,91-2,47	2,19 $\pm$ 0,05	0,192 (0,187-0,198)	9	0,156 (0,146-0,167)	7	1,2
	TORT-2	0,35 $\pm$ 0,13	0,298 $\pm$ 0,013	0,057 (0,055-0,059)	19	0,022 (0,019-0,026)	7	3
Hg	<i>Fucus</i> sp.	0,032 -0,044	0,036 $\pm$ 0,001	0,001 (0,001-0,002)	3	0,003 (0,002-0,004)	8	0,4
	TORT-2	0,270 $\pm$ 0,060	0,304 $\pm$ 0,029	0,012 (0,011-0,013)	4	0,064 (0,059-0,069)	21	0,2

<sup>a</sup> Se llevaron a cabo análisis por triplicado de cada contaminante (media  $\pm$  SD)

<sup>b</sup> Valores bioaccesibles tras dos digestiones independientes, expresadas como media (mínimo-máximo)

<sup>c</sup> Bioaccesibilidad = (Concentración en la fracción bioaccesible) x 100  
(Concentración hallada en la muestra)

<sup>d</sup> Relación de bioaccesibilidad entre el modelo de digestión ME y TIM-1

La aplicación del modelo estadístico de Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE) a los valores de concentraciones bioaccesibles hallados, pone de manifiesto que para ambas muestras existen diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por cada uno de los métodos de digestión gastrointestinal *in vitro*. Los efectos “método de digestión” y “tipo de alimento” son significativos para todos los elementos analizados ( $p < 0,05$ ). La interacción “método de digestión\*tipo de alimento” también es significativa para As, Cd y Hg, pero no para Pb ( $p < 0,05$ ). La representación gráfica del modelo estadístico GEE para cada elemento (figura 10) muestra que para ambos MRCs las pendientes tienen el mismo signo de crecimiento, indicando que cada uno de los dos métodos de digestión (estático o TIM-1) genera valores más altos o más bajos que el otro método.

Diversas condiciones *in vitro* específicas del método estático y dinámico, podrían influir en los resultados obtenidos: pH, tiempos de digestión, concentraciones de enzimas, etapas de la digestión (oral, gástrica, intestinal), y proporción sólido/líquido (Waisberg *et al.*, 2004; Versantvoort *et al.*, 2004). En el caso del TIM-1, otros factores adicionales a considerar son la existencia de una simulación dinámica de los movimientos peristálticos y de los tiempos de tránsito para cada etapa de la digestión (Blanquet *et al.*, 2004; Souliman *et al.*, 2006), así como de los cambios de pH que tienen lugar durante el proceso fisiológico mediante una curva dinámica de pH (Minekus *et al.*, 1995).

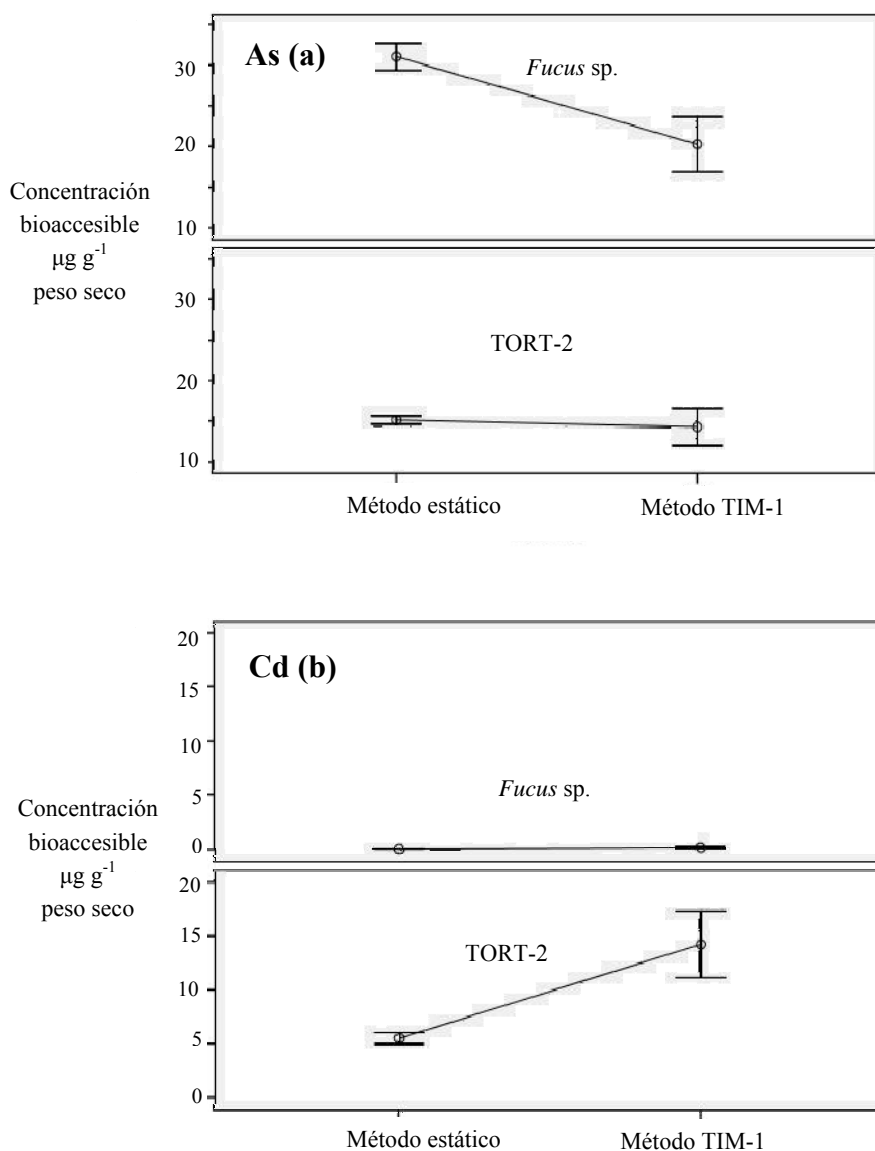
Un aspecto adicional que también debe tenerse en cuenta por la influencia decisiva que podría tener sobre la bioaccesibilidad del elemento,

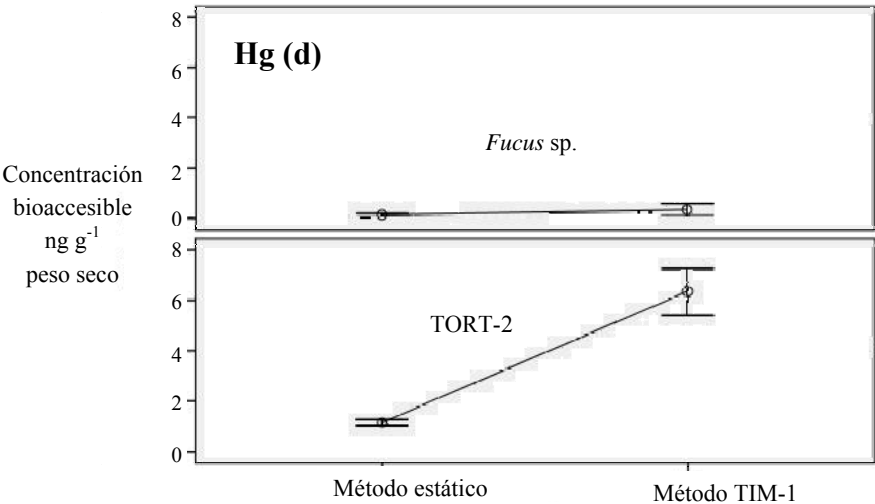
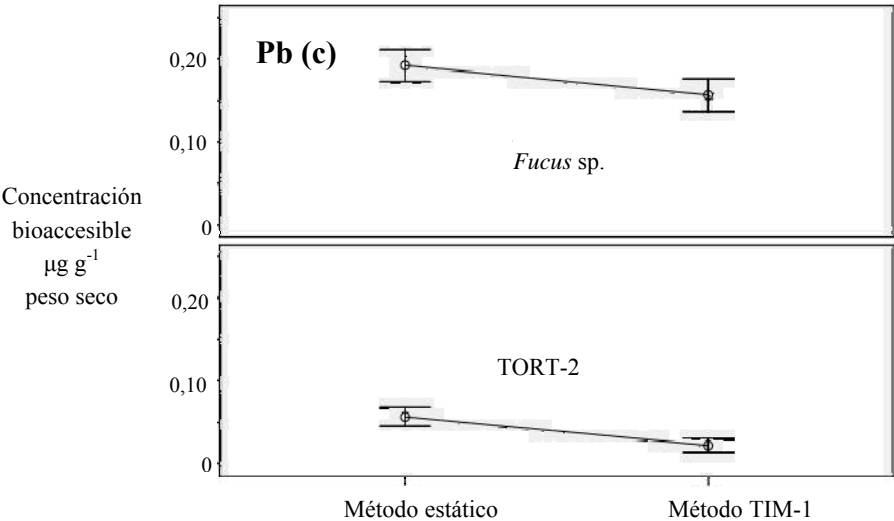
es la forma química en la que éste se encuentra presente en la matriz alimentaria. Las distintas formas químicas de un elemento y sus compuestos se denominan especies y la distribución de un elemento entre sus distintas formas se conoce como especiación. Los análisis de especiación cubren hoy en día un área que abarca desde la determinación de la composición isotópica, estados de oxidación, compuestos inorgánicos y complejos, a complejos orgánicos y organometálicos, y finalmente la investigación de compuestos macromoleculares y complejos (Rosenberg, 2003). Cada elemento está presente en distintas formas químicas en una misma matriz, en este caso en el MRC que será posteriormente digerido con un modelo estático o con TIM-1. Dichas formas químicas podrían influir en la mayor o menor bioaccesibilidad de los elementos objeto de este estudio.



**Figura 10.** Modelos de Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE) para arsénico (a), cadmio (b), plomo (c) y mercurio (d).

Los valores de concentración bioaccesible están expresados con un intervalo de confianza del 95%





### 5.5.1. Bioaccesibilidad del arsénico

En *Fucus* sp., la concentración bioaccesible obtenida por el método estático ( $31,0 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) es superior a la obtenida mediante TIM-1 ( $20,3 \mu\text{g g}^{-1}$  ps). En TORT-2, los resultados son similares ( $15,1$  y  $14,3 \mu\text{g g}^{-1}$  ps para la digestión por ME y TIM-1, respectivamente). La relación de las bioaccesibilidades entre ambos métodos, ME/TIM-1, es superior a la unidad en ambas muestras ( $1,5$  y  $1,1$  para *Fucus* sp. y TORT-2, respectivamente).

La bioaccesibilidad es igual o superior al 50%, indicando que el arsénico se encuentra en las matrices estudiadas en formas químicas fácilmente solubilizables. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta las especies arsenicales halladas en estos MRCs. Para *Fucus* sp., el porcentaje de As aportado por ribofuranósidos que contienen arsénico (arsenoazúcares), representa el 66% del As total (Almela *et al.*, 2005). La fácil solubilización de los arsenoazúcares en agua y la elevada contribución al As total de esta especie podrían explicar las altas bioaccesibilidades halladas. En el caso del TORT-2, en la bibliografía se ha evidenciado que el mayor porcentaje del As (60%) es aportado por la arsenobetaina (AB) (Súñer *et al.*, 2001). La debilidad de la interacción de la unión electrostática entre la AB y el tejido muscular del pescado (Edmonds y Francesconi, 1987) y la alta solubilidad de esta especie en un medio acuoso podrían explicar las altas bioaccesibilidades halladas en TORT-2 por ambos métodos de digestión (71% en el caso del ME y 67% en el caso del TIM-1).

Únicamente Laparra y colaboradores (2007) y Dufailly y colaboradores (2008) han reportado datos sobre bioaccesibilidad de As en MRCs. Laparra y colaboradores (2007) indicaron un 98% de bioaccesibilidad en DORM-2

(músculo de pez perro) empleando el mismo método de digestión estático del presente trabajo. Por su parte, Dufailly y colaboradores (2008), utilizando un procedimiento de filtración continuo en línea que incluye saliva artificial y jugo gástrico e intestinal, han obtenido bioaccesibilidades comprendidas entre 42% y 59% en cuatro MRCs de pescado: TORT-2 (hepatopáncreas de langosta), DOLT-3 (hígado de pez perro), DORM-3 (proteína de pescado) y CRM 627 (músculo de atún). Para TORT-2, la bioaccesibilidad del As hallada por Dufailly y colaboradores (2008) (57%), es menor a la obtenida en el presente estudio (71% para método estático; 67% para TIM-1).

Resulta de especial interés conocer si los altos valores de bioaccesibilidad del As obtenidos por los modelos *in vitro* son acordes a los valores de biodisponibilidad obtenidos mediante ensayos *in vivo*. Los estudios realizados en ratones han puesto de manifiesto una elevada excreción urinaria del tóxico ingerido con el alga *Hizikia fusiforme* (66%-92%) (Ichikawa *et al.*, 2010), lo cual indicaría una elevada biodisponibilidad de As. Sin embargo, la biodisponibilidad absoluta en cerdos alimentados con vegetales y cereales (acelga, rábano, lechuga, arroz y alubias) se ha evidenciado muy variable (33%-100%) (Juhász *et al.*, 2006, 2008). La especie arsenical existente en estas muestras influye significativamente sobre la biodisponibilidad, que es de un 33% cuando el DMA es la especie mayoritaria en el arroz y se eleva a 89% si la especie predominante es el As(V) (Juhász *et al.*, 2006). Los valores de bioaccesibilidad hallados en el presente estudio se engloban dentro del rango de biodisponibilidad obtenido por Juhász y colaboradores.

### 5.5.2. Bioaccesibilidad del cadmio

Las concentraciones bioaccesibles para ambas muestras de referencia son superiores con la digestión TIM-1: *Fucus* sp. (0,061 y 0,180  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps para la digestión estática y TIM-1, respectivamente); TORT-2 (5,48 y 14,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps para el método estático y TIM-1, respectivamente). La relación método estático/TIM-1 es inferior a la unidad para ambas muestras (0,3 y 0,4 para *Fucus* sp. y TORT-2, respectivamente). Por otra parte, la bioaccesibilidad del Cd por ambos métodos de digestión es, en general, inferior a la del As y oscila entre el 12% (*Fucus* sp. digerida por el método estático) y el 53% (TORT-2 digerida por TIM-1).

Las algas son capaces de producir altas cantidades de fitoquelatinas en respuesta a la contaminación por Cd, Pb y Zn (Pawlik-Skowronska, 2001). Además el Cd también podría estar presente en las algas unido a metalotioneínas, polifenoles, polifosfatos y polisacáridos polianiónicos (Pawlik-Skowronska *et al.*, 2007). La unión a estas moléculas podría impedir la solubilización del Cd durante la etapa gástrica. Existen varios ejemplos de este fenómeno descritos en la bibliografía. En muestras de trigo candeal en las que el Cd se halla presente en forma de fitato (mioinositol hexafosfato), se ha puesto de manifiesto que la solubilización de dicho elemento mediante un método *in vitro* no supera el 22% (Chan *et al.*, 2007). La investigación llevada a cabo por Mounicou y colaboradores (2002) en muestras de polvo de cacao, reveló que el Cd ligado a fitatos o microfibras de celulosa cristalina no es liberado durante una digestión gastrointestinal simulada, permaneciendo en el residuo insoluble. El mismo fenómeno podría ocurrir en *Fucus* sp., muestra con un alto contenido en fibra dietética

insoluble, esencialmente constituida por celulosa (Rupérez y Saura-Calixto, 2001), para la que se han hallado bioaccesibilidades inferiores al 35% por ambos métodos de digestión (tabla 28). Una vez más, parece que la forma química podría ser la responsable de los bajos valores de bioaccesibilidad hallados en *Fucus* sp. y no el método de digestión *in vitro* empleado.

En los productos de la pesca, la inducción de metalotioneínas es importante para la detoxificación del Cd. Esta proteína soluble es fácilmente degradada en el tracto digestivo liberando así el Cd (Amiard *et al.*, 2008). Dado que la capacidad de unión de metales a las metalotioneínas es pH dependiente, puede obtenerse una liberación del metal completa o parcial disminuyendo el pH por debajo de 2 (Rosenberg, 2003). Durante la digestión gástrica mediante TIM-1, el pH alcanza valores inferiores a 2 y se mantiene a ese pH durante aproximadamente 2 h. Esta bajada del pH podría explicar la mayor solubilización del Cd por el método TIM-1 en la muestra de TORT-2. No obstante, el mayor tiempo de tránsito que se produce en TIM-1 también podría favorecer la liberación de Cd desde las metalotioneínas. El incremento en el pH que tiene lugar durante la etapa intestinal podría producir la precipitación posterior de parte del Cd solubilizado, a pesar de lo cual la bioaccesibilidad obtenida por el modelo TIM-1 se mantiene más alta que la obtenida por el método estático. A este respecto Oomen *et al.* (2002), mediante la comparación de cinco métodos de digestión *in vitro* con un pH gástrico entre 1,1 y 4, entre los que se incluye el TIM-1, enfatizó la importancia de un pH bajo en la etapa gástrica en la solubilización del Cd desde muestras de suelos.

En la bibliografía no hay datos previos de bioaccesibilidad de Cd en MRCs de algas o pescados. Únicamente se ha realizado un estudio *in vitro* en plantas, que ha reportado valores de bioaccesibilidad de Cd del 65% en hojas de té (INCT-TL-1) y del 57% en hojas de espinaca (SRM 1570a) (Intawongse y Dean, 2008). Con respecto a los estudios *in vivo* solamente tenemos conocimiento de ensayos *in vivo* en muestras de suelos (Schroder *et al.*, 2003). Estos autores hallaron en muestras de suelo una correlación lineal elevada ( $r = 0,80$ ) entre el Cd bioaccesible determinado por un método intestinal *in vitro* estático y el Cd biodisponible relativo medido en un estudio *in vivo* en cerdos jóvenes.

### 5.5.3. Bioaccesibilidad del plomo

Las concentraciones bioaccesibles obtenidas por los métodos de digestión estática y TIM-1 son bajas: *Fucus* sp. (0,192 y 0,156  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps, respectivamente); TORT-2 (0,057 y 0,022  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps respectivamente). Las concentraciones obtenidas por el método estático para los dos MRCs son superiores, como refleja la relación método estático/TIM-1 (1,2 para *Fucus* sp. y 3 para TORT-2). En el caso de *Fucus* sp., es destacable la baja bioaccesibilidad obtenida para este elemento (concentración total =  $2,19 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$  ps; concentración bioaccesible =  $0,192 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$  ps tras la digestión por ME;  $0,156 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$  ps tras la digestión por TIM-1). Este hecho sugiere la posible presencia en el *Fucus* sp. de ligandos que impedirían la solubilización del Pb durante la etapa gástrica. Como en el caso del Cd, entre los posibles candidatos se podrían citar las microfibras de celulosa cristalina y los fitatos (Mounicou *et al.*, 2002). Las fitoquelatinas

presentes en el alga también podrían estar implicadas en una menor solubilización del Pb.

Algunos de los estudios llevados a cabo en suelos también han hallado valores bajos de Pb bioaccesible tras la etapa de digestión intestinal, sugiriendo tres posibles causas: readsorción por la matriz, unión a la pepsina, y precipitación química del Pb debido al mayor pH del compartimento intestinal (Ellickson *et al.*, 2001; Oomen *et al.*, 2002; Van de Wiele *et al.*, 2007). Como ejemplo, Ellickson y colaboradores (2001) tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de una muestra de suelo pusieron de manifiesto una considerable disminución del Pb bioaccesible entre la etapa gástrica (76%) y la etapa intestinal (11%). En el presente estudio, aunque el método estático emplea un pH de 5 durante la etapa intestinal y el sistema TIM-1 alcanza un pH de 7,2, no se observan grandes diferencias en los valores de concentración bioaccesible obtenidos para el Pb, y por ello, los componentes de la matriz a los que puede unirse el Pb parecen influenciar los resultados obtenidos en mayor medida que el pH.

En la literatura no existen datos previos de bioaccesibilidad del Pb en MRCs de algas o pescados. En MRCs de plantas se han reportado valores de bioaccesibilidad de Pb del 19% en hojas de té (INCT-TL-1) y del 33% en hojas de espinaca (SRM 1570a) (Intawongse y Dean, 2008). No se conocen trabajos que estimen la biodisponibilidad del Pb en alimentos por métodos *in vivo*, pero sí existen ensayos *in vivo* realizados en muestras de suelos. En estas matrices se han hallado valores de biodisponibilidad relativa de Pb del 56 al 58% en cerdos jóvenes (Casteel *et al.*, 1997). En un trabajo llevado a cabo sobre un material de referencia de suelo, Ellickson y colaboradores



(2001) obtuvieron un 11% de bioaccesibilidad *in vitro* frente a una biodisponibilidad del 0,7% *in vivo* en ratas. En humanos, tras la ingesta de suelos contaminados, se han descrito biodisponibilidades entre el 18% y el 37% bajo condiciones de ayuno y entre 0,2% y 5% tras la ingestión de alimentos (Maddaloni *et al.*, 1998).

#### 5.5.4. Bioaccesibilidad del mercurio

Las concentraciones de Hg bioaccesible obtenidas por los métodos de digestión estático y TIM-1 son muy bajas: *Fucus* sp. (0,001 y 0,003  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps, respectivamente); TORT-2 (0,012 y 0,064  $\mu\text{g g}^{-1}$  ps, respectivamente). La bioaccesibilidad del Hg es  $\leq 21\%$  en ambos MRCs, valores similares a los hallados para el Pb.

Se ha descrito que la fibra y algunos compuestos polifenólicos son capaces de disminuir la bioaccesibilidad del Hg presente en los productos de la pesca (Shim *et al.*, 2009). Estos compuestos, junto a las fitoquelatinas y metalotioneínas capaces también de unir Hg (Gekeler *et al.*, 1988; Sonne *et al.*, 2009), podrían ser responsables de la baja bioaccesibilidad observada para ambos MRCs. En la muestra de TORT-2, la bioaccesibilidad es mayor con el método TIM-1. Este hecho podría ser en parte consecuencia de una liberación del Hg unido a las metalotioneínas al  $\text{pH} < 2$  que se alcanza durante la etapa gástrica.

No tenemos conocimiento de que se haya estudiado la bioaccesibilidad del Hg en ningún MRC de alimentos. Por ello, los datos aquí reportados son la primera contribución a este respecto. Tampoco tenemos conocimiento de

ensayos *in vivo* que hayan estimado la biodisponibilidad del Hg en alimentos. Hay estudios *in vivo* para suelos que indican una biodisponibilidad del 15-20% para el HgCl<sub>2</sub> (Schoof y Nielsen, 1997), pero las grandes diferencias existentes entre las especies de Hg presentes en suelos (predominantemente inorgánicas) y en alimentos (predominantemente orgánicas) deben ser tenidas en cuenta.

Si bien los resultados encontrados en el presente trabajo de tesis doctoral para los CRMs de alimentos analizados deben considerarse preliminares, el estudio realizado pone de manifiesto la utilidad de los MRCs con fines comparativos, así como la necesidad de ampliar su utilización en los estudios de bioaccesibilidad de elementos traza tóxicos de alimentos.

Ampliar el conocimiento sobre bioaccesibilidad de los elementos traza tóxicos existentes en los alimentos, requeriría el desarrollo de métodos *in vitro* precisos y robustos con incertidumbres identificadas. Estos métodos deberían ser validados previamente mediante estudios *in vivo*. En este sentido, sería recomendable crear una plataforma similar a la plataforma BARGE de suelos, que permita desarrollar, validar y estandarizar métodos *in vitro* específicos para cada elemento y alimento (Schelwald *et al.*, 2001; BARGE, 2010). Siguiendo las líneas recomendadas para suelos, debería disponerse de muestras de alimentos que pudieran ser empleadas para la validación de los métodos *in vitro*.

## Capítulo 6. Conclusiones

Las conclusiones del estudio realizado son:

### *Arsénico total e inorgánico en arroces comercializados en España: efecto del cocinado y estimación del riesgo toxicológico*

- Las concentraciones medias de arsénico total ( $0,201 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) y de arsénico inorgánico ( $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$  ps) contribuyen a establecer valores de línea base para este tóxico en arroces producidos y/o comercializados en España. En el caso del arsénico inorgánico constituyen un importante aporte dada la escasez de datos previos.
- El arsénico inorgánico supone un porcentaje muy amplio con respecto al arsénico total existente en los arroces españoles (27-93%), por lo que la evaluación de la seguridad alimentaria de este producto debe conllevar la determinación analítica de las especies inorgánicas.
- La concentración de arsénico inorgánico en un 18% de los arroces españoles supera la única legislación vigente para este contaminante. Ante el previsible establecimiento por parte de la Unión Europea de un límite máximo de arsénico inorgánico en este cereal, se hace necesario el inicio de actividades de control por parte de las empresas productoras o de los organismos públicos de vigilancia de la seguridad alimentaria.
- El consumo medio de arroz de la población española generaría ingestas de arsénico inorgánico que no superan el valor toxicológico de referencia, si bien podría suponer un alimento de riesgo para consumidores extremos del cereal.

– El cocinado del arroz en agua contaminada con As(V) conlleva un incremento del tóxico (47-100%) en el producto tal y como es consumido por la población. El consumo de estos arroces daría lugar a ingestas de riesgo. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de considerar el aporte de arsénico inorgánico de los alimentos cocinados en áreas con exposición crónica al contaminante, en las que en la actualidad sólo se establecen relaciones dosis-efecto en función de la ingesta de arsénico inorgánico a través del agua de bebida.

*Especies arsenicales y bioaccesibilidad en arroces comercializados en Argentina y Bolivia*

- Las concentraciones de arsénico inorgánico en arroces comercializados en Argentina y Bolivia constituyen la primera caracterización del tóxico realizada en arroces latinoamericanos.
- Un elevado porcentaje de los arroces latinoamericanos (78%) supera el intervalo normal de arsénico total descrito para arroces de otros orígenes, mientras que la concentración media de arsénico inorgánico está muy próxima al valor medio de otros estudios.
- Una elevada proporción del arsénico existente en los arroces latinoamericanos crudos y cocinados se solubiliza tras la digestión gastrointestinal (64-102%). Tanto DMA como arsénico inorgánico se detectan en la fracción soluble, siendo el DMA la especie mayoritaria.

*Bioaccesibilidad de mercurio en peces depredadores crudos y cocinados comercializados en España*

- Un 37% de las muestras de los peces depredadores analizados exceden el límite máximo de mercurio admitido ( $1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ph}$ ), indicando que estos productos constituyen un problema de seguridad alimentaria en nuestro país.
- El cocinado a la plancha de pez espada, cazón, bonito y atún produce un incremento en la concentración de mercurio como consecuencia, principalmente de la pérdida de agua durante el cocinado.
- La bioaccesibilidad del mercurio es muy variable en los pescados crudos (17-87%) y cocinados (6-49%). El cocinado produce un descenso en la bioaccesibilidad de mercurio que sólo es significativo en pez espada y atún.
- El metilmercurio es la especie mayoritaria en la fracción bioaccesible del pez espada crudo.
- Existen diferencias entre la estimación del riesgo toxicológico asociado al consumo de peces depredadores cuando esta se realiza a partir de las concentraciones de mercurio en el pescado o de las concentraciones bioaccesibles en pescados cocinados, hecho que podría ser considerado con vistas a una evaluación más realista del riesgo.

*Comparación de un método de digestión gastrointestinal in vitro estático y el método dinámico TIM-1 para estimar la bioaccesibilidad de As, Cd, Pb y Hg de materiales de referencia certificados de alimentos*

- Los dos métodos de digestión gastrointestinal ensayados producen concentraciones bioaccesibles de arsénico, cadmio, plomo y mercurio que difieren significativamente. El efecto del método sobre las especies químicas del tóxico presentes en cada matriz podría estar implicado en estas diferencias.
- Es necesario ampliar los estudios de bioaccesibilidad de elementos traza tóxicos en alimentos utilizando materiales de referencia. El uso de este tipo de muestras permitiría comparar distintos métodos *in vitro* o establecer la robustez de un mismo método *in vitro* por diferentes laboratorios.

## Capítulo 7. Difusión de los resultados

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral han dado lugar a cinco publicaciones y a varias comunicaciones en congresos.

### 7.1. Publicaciones

Torres-Escribano S., Leal M., Vélez D., Montoro R. Total and inorganic arsenic concentrations in rice sold in Spain, effect of cooking, and risk assessments. *Environmental Science and Technology*, **2008**, 42, 3867-3872.

Torres-Escribano S., Vélez D., Montoro R. Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2010**, 27, 327-337.

Torres-Escribano S., Blanquet-Diot S., Denis S., Calatayud M., Barrios L., Alric M., Vélez D., Montoro R. Comparison of a static and a dynamic *in vitro* model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Science of the Total Environment*, **2011**, 409, 604-611.

Torres-Escribano S., Ruiz A., Barrios L., Vélez D., Montoro R. Influence of Hg bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2011**, 91, 981-986.

Torres-Escribano S., Morisio Y., Ruiz A., Vaca I., Farias S., Garrido J.M., Cerbant R., Vélez D., Montoro R. Arsenic species contents and bioaccessibility in Argentinian and Bolivian rice. *Environmental Science and Technology*. Enviado.

## **7.2. Comunicaciones en congresos**

Torres S., Montoro R., Vélez D., Barberá R. Estimación de la bioaccesibilidad del mercurio en pez espada. Póster presentado en CIBSA 2006, I Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria “De la granja a la mesa, ida y vuelta”. Sevilla, España, Mayo 2006.

Sotos M., Torres S., Vélez D., Montoro R. Aporte de mercurio a la dieta a través del consumo de pez espada (*Xiphias gladius*). Póster presentado en III Congreso de la Asociación Española de Dietistas – Nutricionistas. Madrid, España, Octubre 2006.

Torres S., Leal M., Calatayud M., Devesa V., Vélez D., Montoro R. Contenidos de arsénico total e inorgánico en arroces comercializados en España: efecto del cocinado y evaluación de riesgos. Comunicación oral en AETOX 2007, XVII Congreso de la Asociación Española de Toxicología. Santiago de Compostela, España, Septiembre, 2007.



Torres S., Calatayud M., Devesa V., Vélez D., Montoro R., Barberá R. Mercurio total y bioaccesible en pescados crudos y cocinados. Comunicación oral en AETOX 2007, XVII Congreso de la Asociación Española de Toxicología. Santiago de Compostela, España, Septiembre, 2007.

Torres-Escribano S., Denis S., Blanquet S., Alric M., Devesa V., Vélez D., Montoro R. Determination of bioaccessibility of arsenic in food reference samples by “in vitro” digestion procedures. Comparison between a static method and a dynamic multicompartmental method (TIM). Póster presentado en 2nd International Congress “Arsenic in the environment: Arsenic from nature to humans”. Valencia, España, Mayo, 2008.

Torres-Escribano S., Farias S., Morisio Y., Devesa V., Vélez D., Montoro R. Arsenic species contents and bioaccessibility in Argentinian rice. Póster presentado en 2nd International Congress “Arsenic in the environment: Arsenic from nature to humans”. Valencia, España, Mayo, 2008.

## Capítulo 8. Bibliografía

- Abedin M. J., Cotter-Howells J., Meharg A. A. Arsenic uptake and accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) irrigated with contaminated water. *Plant Soil*, **2002**, 240, 311-319.
- Ackerman A. H., Creed P. A., Parks A. N., Fricke M. W., Schwegel C. A., Cred J. T., Heitkemper D. T., Vela N. P. Comparison of a chemical enzymatic extraction of arsenic from rice and an assessment of the arsenic absorption from contaminated water by cooked rice. *Environmental Science and Technology*, **2005**, 39, 5241-5246.
- AESA, Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, **2006**. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas. Madrid, 30 de mayo de 2006. <http://www.aesan.msc.es/aesa>.
- AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, **2008**. [http://www.aesan.mspsi.es/AESAN/web/cadena\\_alimentaria/subdetalle/aesan\\_mercurio.shtml](http://www.aesan.mspsi.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subdetalle/aesan_mercurio.shtml).
- Afonso C., Lourenço H. M., Dias A., Nunes M. L., Castro M. Contaminant metals in black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) caught off Madeira and the Azores. *Food Chemistry*, **2007**, 101, 120-125.
- Agusa T., Kunito T., Minh T. B., Trang P. T. K., Iwata H., Viet P. H., Tanabe S. Relationship of urinary arsenic metabolites to intake estimates in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Environmental Pollution*, **2009**, 157, 396-403.

- Alastuey A., Mantilla E., Querol X., Rodríguez S. Study and evaluation of atmospheric pollution in Spain: necessary measures arising from the EC directive on PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> in the ceramic industry. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, **2000**, 39, 141-148.
- Almela C., Algora S., Benito V., Clemente M. J., Devesa V., Súnier M. A., Vélez D., Montoro R. Heavy metal, total arsenic and inorganic arsenic contents of algae food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 918-923.
- Almela C., Laparra J. M., Vélez D., Barberá R., Farré R., Montoro R. Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: characterization and bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 7344-7351.
- Almela C., Clemente M. J., Vélez D., Montoro R. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food and Chemical Toxicology*, **2006**, 44, 1901-1908.
- Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Charbonnier L., Mesnil A., Rainbow P. S., Wang W.-X. Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46, 2010-2022.

- Aposhian H. V., Gurzau H. S., Le X. C., Gurzau A., Healy S. M., Lu X., Ma M., Yip L., Zakharyan R. A., Maiorino R. M., Dart R. C., Tircus M. G., Gonzalez-Ramirez D., Morgan D. L., Avram D., Aposhian M. M. Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chemical Research in Toxicology*, **2000**, *13*, 693-697.
- Apostoli P., Giusti S., Bartoli D., Perico A., Bavazzano P., Alessio L. Multiple exposure to arsenic, antimony, and other elements in art glass manufacturing. *American Journal of Industrial Medicine*, **1998**, *34*, 65-72.
- Aylett B. J. Mercury. En : Bailar J. C., Eméleus Jr J., Nyholm R., Trotman-Dickenson A. F. eds. *Comprehensive inorganic chemistry*, Vol. 3, Oxford, Pergamon Press, **1973**, pp. 275-328.
- Azenha M. A., Vasconcelos M. T. Pb and Cu speciation and bioavailability in port wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, *48*, 5740-5749.
- Bae M., Watanabe C., Inaoka T., Sekiyama M., Sudo N., Bokul M. H., Ohtsuka R. Arsenic in cooked rice in Bangladesh. *Lancet*, **2002**, *360*, 1839-1840.
- BARGE (Bioaccessibility Research Group of Europe), **2010**. [www.bgs.ac.uk/barge/home.html](http://www.bgs.ac.uk/barge/home.html).
- Blanco S.L., González J.C., Vieites J.M. Mercury, cadmium and lead levels in samples of the main traded fish and shellfish species in Galicia, Spain. *Food Additives and Contaminants: Part B*, **2008**, *1*, 15-21.

- Blanco-Penedo I., López-Alonso M., Miranda M., Hernández J., Prieto F., Shore R. F. Non-essential and essential trace elements concentrations in meat in cattle reared under organic, intensive or conventional production systems. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2010**, 27, 36-42.
- Blanquet S., Zeijdner E., Beyssac E., Meunier J.-P., Denis S., Havenaar R., Alric M. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behaviour of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical Research*, **2004**, 21, 585-591.
- Blanquet S., Garrait G., Beyssac E., Perrier C., Denis S., Hébrard G., Alric M. Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze dried recombinant yeasts as novel oral drug delivery systems assessed by an artificial digestive system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2005**, 61, 32-39.
- Blanquet-Diot S., Soufi M., Rambeau M., Rock E., Alric M. Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes studied in a dynamic gastrointestinal system. *Journal of Nutrition*, **2009**, 139, 876-883.
- Bocio A., Nadal M., Domingo J. L. Human exposure to metals through the diet in Tarragona, Spain: Temporal trend. *Biological Trace Element Research*, **2005**, 10, 193-201.
- Boening D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury. A general review, *Chemosphere*, **2000**, 40, 1335- 1351.

- Bordajandi L. R., Gómez G., Abad E., Rivera J., Fernández-Bastón M. M., Blasco J., González M. J. Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): levels and health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 992-1001.
- Branco V., Canario J., Vale C., Raimundo J., Reis C. Total and organic mercury concentrations in muscle tissue of the blue shark (*Prionace glauca* L. 1758) from the Northeast Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, **2004**, 49, 871-874.
- Branco V., Vale C., Canário J., Santos M. N. D. Mercury and selenium in blue shark (*Prionace glauca*, L. 1758) and swordfish (*Xiphias gladius*, L. 1758) from two areas of the Atlantic Ocean. *Environmental Pollution*, **2007**, 150, 373-380.
- Burger J., Dixon C., Boring C. S., Gochfeld M. Effect of deep-frying fish on risk from mercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, **2003**, 66, 817-828.
- Burger J., Gochfeld M. Mercury in fish available in supermarkets in Illinois: Are there regional differences. *Science of the Total Environment*, **2006**, 367, 1010-1016.
- Cabañero A. I., Madrid Y., Cámara C. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an *in vitro* digestion method. *Analytical Chimica Acta*, **2004**, 526, 51-61.

- Cabañero A. I., Madrid Y., Cámara C. Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an *in vitro* digestion method. *Biological Trace Element Research*, **2007**, *119*, 195-211.
- Calatayud M., Ruiz A., Devesa V., Villaamil E., Montoro R., Vélez D. Characterizing arsenic exposure of child populations in Northern Argentina. 2nd International Congress “Arsenic in the environment: arsenic from nature to humans”. Book of abstracts, **2008**, pp. 455-456.
- Casteel S. W., Cowart R. P., Weis C. P., Henningsen G. M., Hoffman E., Brattin W. J., Guzman R. E., Starost M. F., Payne J. T., Stockham S. L., Becker S. V., Drexler J. W., Turk J. R. Bioavailability of lead to juvenile swine dosed with soil from the Smuggler Mountain NPL site of Aspen, Colorado. *Fundamental and Applied Toxicology*, **1997**, *36*, 177-187.
- Cava-Montesinos P., De la Guardia A., Teutsch C., Cervera M. L., De la Guardia M. Non-chromatographic speciation analysis of arsenic and antimony in milk hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* , **2003**, *493*, 195-203.
- Cave M. R., Wragg J., Harrison I., Vane C. H., Van de Wiele T., De Groeve E., Nathanail C. P., Ashmore M., Thomas R., Robinson J., Daly P. Comparison of batch mode and dynamic physiologically based bioaccessibility test for PAHs in soil samples. *Environmental Science and Technology*, **2010**, *44*, 2654-2660.

- Chakraborti D., Rahman M. M., Paul K., Chowdhury U. K., Sengupta M. K., Lodh D., Chanda C. R., Saha K. C. Mukherjee S. C. Arsenic calamity in the Indian subcontinent: What lessons have been learned? *Talanta*, **2002**, 58, 3-22.
- Champagne E. T., Wood D. F., Juliano B. O., Bechtel D. B. The rice grain and its gross composition. En *Rice: Chemistry and Technology*, third edition, Champagne E. T. Ed, American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota, USA, **2004**, pp. 77-107.
- Chan D. Y., Black W. D., Hale B. A. Cadmium bioavailability and bioaccessibility as determined by *in vitro* digestion, dialysis and intestinal epithelial monolayers, and compared to *in vivo* data. *Journal of Environmental Science Health Science and Health A*, **2007**, 42, 1283-1291.
- Chang L. F., Jiang S. J., Sahayam A. C. Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1176, 143-148.
- Chen M. H., Chen C. Y., Chang S. K., Huang S. W. Total and inorganic mercury concentrations in the white muscles of swordfish (*Xiphias gladius*) from the Indian and Atlantic oceans. *Food Additives and Contaminants*, **2007**, 24, 969-975.
- Chicourel E. L., Sakuma A. M., Zenebon O., Tenuta-Filho A. Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **2001**, 51, 288-292.



- Childs N. W. Production and utilization of rice. En: Rice: Chemistry and Technology, third edition, Champagne, E. T. Ed, American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota, USA, **2004**, pp. 1-24.
- Choong T. S. Y., Chuah T. G., Robiah Y., Gregory Koay F. L., Azni I. Arsenic toxicity, health hazards and removal techniques from water: an overview. *Desalination*, **2007**, *217*, 139-166.
- Clarkson T. W. Human exposure to mercury: the three modern dilemmas. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **1998**, *11*, 303-317.
- Concha G., Nermell B., Vahter M. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environmental Health Perspectives*, **1998**, *106*, 355-359.
- Cortes S., Fortt A. Mercury contents in Chilean fish and estimated intake levels. *Food Additives and Contaminants*, **2007**, *24*, 955-959.
- CSN (Consejo de Seguridad Nuclear), **2002**. Estudio sobre dietas y hábitos alimentarios en la población española. Colección de documentos CSN. Referencia Doc 05.01.
- Cullen W. R., Reimer K. J. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews*, **1989**, *89*, 713-784.
- Dabeka R. W., McKenzie A. D., Lacroix G. M. A., Cleroux C., Bowe S., Graham R. A., Conacher H. B. S., Verdier P. Survey of arsenic in total diet food composites and estimation of the dietary intake of arsenic by Canadian adults and children. *Journal of AOAC International*, **1993**, *76*, 14-25.

- D'Amato M., Forte G., Caroli S. Identification and quantification of major species of arsenic in rice. *Journal of AOAC International*, **2004**, 87, 238-243.
- Das H. K., Mitra A. K., Sengupta P. K., Hossain A., Islam F., Rabbani G. H. Arsenic concentration in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: a preliminary study. *Environment International*, **2004**, 30, 383-387.
- Dasgupta T., Hossain S. A., Meharg A. A., Price A. H. An arsenate tolerance gene on chromosome 6 of rice. *New Phytologist*, **2004**, 163, 45-49.
- Delgado-Andrade C., Navarro M., López H., López M. C. Determination of total arsenic levels by hydride generation atomic absorption spectrometry in foods from south-east Spain: estimation of daily dietary intake. *Food Additives and Contaminants*, **2003**, 20, 923-932.
- Del Razo L. M., García-Vargas G. G., García-Salcedo J., Sanmiguel M. F., Rivera M., Hernández M. C., Cebrián M. E. Arsenic levels in cooked food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, Mexico. *Food and Chemical Toxicology*, **2002**, 40, 1423-1431.
- Devesa V., Del Razo L. M., Adair B., Drobna Z., Waters S., Hughes M., Styblo M., Thomas D. J. Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2004**, 19, 1460-1467.

- Díaz O. P., Leyton I., Muñoz O., Núñez N., Devesa V., Súnier M. A., Vélez D., Montoro R. Contribution of water, bread and vegetables (raw and cooked) to dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of Northern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 1773-1779.
- D'Ilio S., Alessandrelli M., Cresti R., Forte G., Caroli S. Arsenic contents of various types of rice as determined by plasma-based techniques. *Microchemical Journal*, **2002**, 73, 195-201.
- Dobson A. J. An Introduction to Generalized Linear Models. 2nd ed. Boca Raton, FL, Chapman & Hall/CRC, **2002**.
- Dufailly V., Guérin T., Noël L., Frémy J.-M., Beauchemin D. A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion-exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2008**, 23, 1263-1268.
- EC (European Commission), **2003**. Commission Directive 2003/2/EC of 6 January 2003 relating to restrictions on the marketing and use of arsenic (tenth adaptation to technical progress to Council Directive 76/769/EEC).
- EC (European Commission), **2004**. Directive 2004/107/EC of the European Parliament and of the Council of 15 December 2004 relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air. Official Journal of the European Union L23/3.

- EC (European Commission), **2006**. Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union L364/5.
- EC (European Commission), **2007**. Directive 2007/51/EC of the European Parliament and of the Council of 25 September 2007 amending Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing of certain measuring devices containing mercury. Official Journal of the European Union L257/15.
- EC (European Commission), **2008**. Commission Regulation (EC) No. 629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union L173/6.
- Edmonds J. S., Francesconi K.A. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*, **1987**, 43, 553-557.
- EFSA, **2004**. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. The EFSA Journal, 34, 1-14. <http://www.efsa.eu.int>.
- EFSA, **2009**. Scientific opinion on arsenic in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), EFSA Journal; 7 (10): 1351, [198 pp.]. EFSA, Parma, Italy. [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/esfa\\_locale\\_1178620753812\\_1211902959840.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/esfa_locale_1178620753812_1211902959840.htm).

- Ellickson K. M., Meeker R. J., Gallo M. A., Buckley B. T., Lioy P. J. Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **2001**, *40*, 128-135.
- Falcó G., Llobet J. M., Bocio A., Domingo J. L. Daily intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by consumption of edible marine species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, *54*, 6106-6112.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations), **2007**. Food Consumption. [http:// faostat.fao.org/site/346/default.aspx](http://faostat.fao.org/site/346/default.aspx).
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations), **2010**. Food Consumption. <http://www.fao.org/economic/ess/food-security-statistics/en/>.
- Farias L. A., Favaro D. I. T., Maihara V. A., Vasconcellos M. B. A., Yuyama L. K., Aguiar J. P. L., Alencar F. J. Assessment of daily dietary intake of Hg and some essential elements in diets of children from the Amazon region. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **2006**, *270*, 217-223.
- Forsyth D. S., Casey R., Dabeka R. W., McKenzie A. Methylmercury levels in predatory fish species marketed in Canada. *Food Additives and Contaminants*, **2004**, *21*, 849-856.
- Freeman G. B., Dill J. A., Johnson J. D., Kurtz P. J., Parham F., Matthews H. B. Comparative absorption of lead from contaminated soil and lead salts by weanling Fischer 344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, **1996**, *33*, 109-119.

- FSA (Food Standards Agency), **2004**. Arsenic in seaweed, July 2004. <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/arsenicseaweed.pdf>, p. 4.
- FSA (Food Standards Agency), **2008**. Food Standards Agency of UK. <http://www.eatwell.gov.uk/healthydiet/nutritionessentials/fishandshellfish>.
- Fussenegger D., Suppin D., Raheem A., Widhalm K. What kind of fish on the table? Omega-3 fatty acids versus mercury contamination. *Journal für Ernährungsmedizin*, **2007**, 9, 6-13.
- Gao Y., Yan C. H., Wang Y., Xie H. F., Zhou X., Yu X. D., Yu X. G., Tong S., Zhou Q. X., Shen X. M. Prenatal exposure to mercury and neurobehavioral development neonates in Zhoushan City, China. *Environmental Research*, **2007**, 105, 390-399.
- Gaona X. El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. Tesis doctoral. Departament de Química. Universitat Autònoma de Barcelona, **2004**.
- Gekeler W., Grill E., Winnacker E. L., Zenk M H. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology*, **1988**, 150, 197-202.
- Goffman F. D., Berman C. J. Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2004**, 84, 1235-1240.

- Hagens W. I., Walraven N., Minekus M., Havenaar R., Lijzen J. P. A., Oomen A. G. Relative oral bioavailability of lead from Dutch made grounds. RIVM Report 711701086A. National Institute for Public Health and the Environment, The Netherlands. **2009**.
- Hardin J. W., Hilbe J. M. Generalized Estimating Equations. New York: Chapman & Hall/CRC, 2003.
- Health Canada, **2008**. Health Canada's revised assessment of mercury in fish enhances protection while reflecting advice in Canada's Food Guide. [http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/\\_2007/2007\\_31-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/_2007/2007_31-eng.php).
- Heikens A. Arsenic contamination of irrigation water, soil and crops in Bangladesh: Risk implications for sustainable agriculture and food safety in Asia. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Regional Office for Asian and the Pacific, Bangkok, **2006**.
- Heitkemper D. T., Vela N. P., Stewart K. R., Westphal C. S. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2001**, 16, 299-306.
- Herreros M. A., Iñigo-Núñez S., Sánchez-Pérez E., Encinas T., González-Bulnes A. Contribution of fish consumption to heavy metals exposure in women of childbearing age from a Mediterranean country (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 40, 1591-1595.

- Higuera P., Oyarzun R., Biester H., Lillo J., Lorenzo S. A first insight into mercury distribution and speciation in the Almadén mining district, Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, **2003**, 80, 95-104.
- Higuera P., Oyarzun R., Lillo J., Sánchez Hernández J. C., Molina J. A. The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg contaminated sites. *Science of the Total Environment*, **2006**, 356, 112-124.
- Hironaka H., Ahmad S. A. Arsenic concentration of rice in Bangladesh. International Symposium on fate of arsenic in the environment, Dhaka, Bangladesh. Ahmed F., Ali M. A., Adeel Z. Eds. BUET-UNU, Japan. **2003**.
- Horvat M. Mercury-Do we know enough? En: Trace element speciation for environment, food and health. Ebdon L., Pitts L., Cornelis R., Crews H., Donard O. F. X., Quevauviller P. Eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2001**, capítulo 7, p. 127.
- Horvat M., Nolde N., Fajon V., Jereb V., Logar M., Lojen S., Jacimovic R., Falnoga I., Liya Q., Faganeli J., Drobne D. Total mercury, methylmercury and selenium mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, **2003**, 304, 231-256.
- Hossain M. Long-term prospects for the global rice economy, FAO Rice Conference. Rome, Italy, 12-13 February **2004**.  
<http://www.fao.org/rice2004/en/pdf/hossain.pdf>.



- Hylander L. D., Meili M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Science of the Total Environment*, **2003**, 304, 13-27.
- IARC (International Agency for Cancer Research), **1993**. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. International Agency for Cancer Research, Lyon, 1993. Volume 58.
- IARC (International Agency for Cancer Research), **2002**. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking-water disinfectants and contaminants including arsenic. International Agency for Cancer Research, Lyon, 2002, Volume 84, pp.15-22.
- Ichikawa S., Nozawa S., Hanaoka K., Kaise T. Ingestion and excretion of arsenic compounds present in edible brown algae, *Hizikia fusiforme*, by mice. *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, 48, 465-469.
- Intawongse M., Dean J. R. *In-vitro* testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, 25, 876-886.
- Intawongse M., Dean J. R. Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environmental Pollution*, **2008**, 152, 60-72.
- Jackson B. P., Bertsch P. Determination of arsenic speciation in poultry wastes by IC-ICP-MS. *Environmental Science and Technology*, **2001**, 35, 4868-4873.

- Jedrychowski W., Perera F., Jankowski J., Rauh V., Flak E., Caldwell K. L., Jones R. L., Pac A., Lisowoska-Misczyk I. L. Fish consumption in pregnancy, cord blood mercury level and cognitive and psychomotor development of infants followed over the first three years of life. Karkow epidemiological study. *Environmental International*, **2007**, 8, 1057-1062.
- Jorhem L., Åstrand C., Sundström B., Baxter M., Stokes P., Lewis J., Grawe K. P. Elements in rice from the Swedish market: 1. Cadmium, lead and arsenic (total and inorganic). *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2008**, 25, 284-292.
- Juhasz A. L., Smith E., Weber J., Rees M., Kuchel T., Sansom L. *In vivo* assessment of arsenic bioavailability in rice and its significance for human health risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, **2006**, 12, 1826-1831.
- Juhasz A. L., Smith E., Weber J., Rees M., Rofe A., Kuchel T., Sansom L., Naidu R. Comparison of *in vivo* and *in vitro* methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. *Chemosphere*, **2007**, 69, 961-966.
- Juhasz A. L., Smith E., Weber J., Rees M., Rofe A., Kuchel T., Sansom L., Naidu R. Application of an *in vivo* swine model for the determination of arsenic bioavailability in contaminated vegetables. *Chemosphere*, **2008**, 71, 1963-1969.

- Koch I., McPherson K., Smith P., Easton L., Doe K. G., Reimer K. J. Arsenic bioaccessibility and speciation in clams and seaweed from a contaminated marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **2007a**, 54, 586-594.
- Koch I., Sylvester S., Lai V. W.-M., Owen A., Reimer K. J., Cullen W. R. Bioaccessibility and excretion of arsenic in *Niu Huang Jie Du Pian* pills. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2007b**, 222, 357-364.
- Kojadinovic J., Potier M., Le Corre M., Cosson R. R., Bustamante P. Mercury content in commercial pelagic fish and its risk assessment in the Western Indian Ocean. *Science of the Total Environment*, **2006**, 366, 688-700.
- Laird B. D., Shade C., Gantner N., Chan H. M., Siciliano S. D. Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an *in vitro* gastrointestinal model is independent of mercury concentration. *Science of the Total Environment*, **2009a**, 407, 6003-6008.
- Laird B. D., Yeung J., Peak D., Siciliano S. D. Nutritional status and gastrointestinal microbes affect arsenic bioaccessibility from soils and mine tailings in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Environmental Science and Technology*, **2009b**, 43, 8652-8657.
- Lamont, W. H. Concentration of inorganic arsenic in samples of white rice from the United States. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2003**, 16, 687-695.

- Laparra J. M., Vélez D., Montoro R., Barberá R., Farré R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an *in vitro* digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, *51*, 6080-6085.
- Laparra J. M., Vélez D., Montoro R., Barberá R., Farré R. Bioaccessibility of inorganic arsenic species in raw and cooked *Hizikia fusiforme* seaweed. *Applied Organometallic Chemistry*, **2004**, *18*, 662-669.
- Laparra J. M., Vélez D., Barberá R., Farré R., Montoro R. Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice. Practical aspects for human health risk assessments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, *53*, 8829-8833.
- Laparra J. M., Vélez D., Barberá R., Montoro R., Farré R. Bioaccessibility and transport by Caco-2 cells of organoarsenical species present in seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, *55*, 5892-5897.
- Le X.-C., Cullen W. R., Reimer K. J. Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab, and shrimp. *Clinical Chemistry*, **1994**, *40*, 617-624.
- Leist M., Casey R. J., Caridi D. The management of arsenic wastes: problems and prospects. *Journal of Hazardous Materials*, **2000**, *B76*, 125-138.
- Liang F., Li Y., Zhang G., Tan M., Lin J., Liu W., Li Y., Lu W. Total and speciated arsenic levels in rice from China. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2010**, *27*, 810-816.

- Llobet J. M., Falcó G., Casas C., Teixidó A., Domingo J. L. Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, *51*, 838-842.
- Lombi E., Scheckel K. G., Pallon J., Carey A. M., Zhu Y. G., Meharg A. A. Speciation and distribution of arsenic and localization of nutrients in rice grains. *New Phytologist*, **2009**, *184*, 193-201.
- Maddaloni M., Lolocono N., Manton W., Blum C., Drexler J., Graziano J. Bioavailability of soilborne lead in adults, by stable isotope dilution. *Environmental Health Perspectives*, **1998**, *106*, 1589-1597.
- MAFF. Survey of mercury in food: Second Supplementary report. Food Surveillance Paper No. 17. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. London, **1987**.
- Mandal B. K., Suzuki K. T. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, **2002**, *58*, 201-235.
- Martí-Cid R., Bocio A., Llobet J. M., Domingo J. L. Intake of chemical contaminants through fish and seafood consumption by children of Catalonia, Spain: Health risks. *Food and Chemical Toxicology*, **2007**, *45*, 1968-1974.
- Meharg A. A., Rahman M. Arsenic contamination of Bangladesh paddy field soils: Implications for rice contribution to arsenic consumption. *Environmental Science and Technology*, **2003**, *37*, 229-234.

- Meharg A. A. Arsenic in rice – understanding a new disaster for South-East Asia. *Trends in Plant Science*, **2004**, 9, 415-417.
- Meharg A. A., Lombi E., Williams P. N., Scheckel K. G., Feldmann J., Raab A., Zhu Y., Islam R. Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains. *Environmental Science and Technology*, **2008a** 42, 1050–1057.
- Meharg A. A., Sun G., Williams P. N., Adomako E., Deacon C., Zhu Y.-G., Feldmann J., Raab A. Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. *Environmental Pollution*, **2008b**, 152, 746-749.
- Meharg A. A., Deacon C., Campbell C. J., Carey A-M., Williams P. N., Feldmann J., Raab A. Inorganic arsenic levels in rice milk exceed EU and US drinking water standards. *Journal of Environmental Monitoring*, **2008c**, 10, 428-431.
- Meharg A. A., Williams P. N., Adomako E., Lawgali Y. Y., Deacon C., Villada A., Cambell R. C. J., Sun G., Zhu Y. G., Feldmann J., Raab A., Zhao F. J., Islam R., Hossain S., Yanai J. Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environmental Science and Technology*, **2009**, 43, 1612-1617.
- Melgar M. J., Alonso J., García. A. Mercury in edible mushrooms and underlying soil: bioconcentration factors and toxicological risk. *Science of the Total Environment*, **2009**, 407, 5328-5334.

- Metian M., Charbonnier L., Oberhaënsli F., Bustamante P., Jeffree R., Amiard J. C., Warnau M. Assessment of metal, metalloid, and radionuclide bioaccessibility from mussels to human consumers, using centrifugation and simulated digestion methods coupled with radiotracer techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2009**, 72, 1499-1502.
- Meunier L., Walter S. R., Wragg J., Parsons M. B., Koch I., Jamieson H. E., Reimer K. J. Effects of soil composition and mineralogy on the bioaccessibility of arsenic from tailings and soil in gold mine districts of Nova Scotia. *Environmental Science and Technology*, **2010**, 44, 2667-2674.
- Minekus M., Marteau P., Havenaar R., Huis in't Veld J. H. J. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Atla*, **1995**, 23, 197-209.
- Minekus M., Smeets-Peeters M., Bernalier A., Marol-Bonnin S., Havenaar R., Marteau P., Alric M., Fonty G., Huis in't Veld J. H. J. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied and Microbiology Biotechnology*, **1999**, 53, 108-114.
- Mira N. V. M. D., Lanfer-Marquez U. M. Avaliação da composição centesimal, aminoácidos e mercúrio contaminante de surimi. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2005**, 24, 665-671.

- Mitchell P., Barr D. The nature and significance of public exposure to arsenic – a review of its relevance to south-west England. *Environmental Geochemistry and Health*, **1995**, 17, 57-82.
- Montagnani R., Campagna M., Gasparello S., Hreiglich A., Apostoli P. Exposure to arsenic in the manufacture of glass rods. Results of the biological monitoring and preventive indications. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*, **2006**, 28, 158-162.
- Monteiro L. R., Lopes H. D. Mercury content of swordfish, *Xiphias gladius*, in relation to length, weight, age, and sex. *Marine Pollution Bulletin*, **1990**, 21, 293-296.
- Moreno-Rojas R., Sánchez-Segarra P. J., Cámara-Martos F., Amaro-López M. A. Heavy metals levels in Spanish chesses. Influence of manufacturing conditions. *Food Additives and Contaminants: Part B*, **2010**, 3, 90-100.
- Morgan S., Berry M. R., Graves R. L. Effects of commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessments *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, **1997**, 7, 119-134.
- Morgano M. A., Gomes P. C., Montovani D. M. B., Perrone A. A. M., Santos T. F. Mercury levels in freshwater fishes from piscicultures established in São Paulo State, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2005**, 24, 665-671.



- Mounicou S., Szpunar J., Andrey D., Blake C., Lobinski R. Development of a sequential enzymolysis approach for the evaluation of the bioaccessibility of Cd and Pb from cocoa. *Analyst*, **2002**, 127, 1638-1641.
- Muñoz O., Vélez D., Montoro R. Rapid and quantitative release, separation and determination of inorganic arsenic (AsIII+AsV) in seafood products by microwave-assisted distillation and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1999**, 14, 1607-1613.
- Muñoz O., Devesa V., Súañer M. A., Vélez D., Montoro R., Urieta I., Macho M. L., Jalón M. Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 4369-4376.
- Muñoz O., Díaz O. P., Leyton I., Núñez N., Devesa V., Súañer M.A., Vélez D., Montoro R. Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: Total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 642-647.
- Muñoz O., Bastias J. M., Araya M., Morales A., Orellana C., Rebolledo R., Vélez D. Estimation of the dietary intake of cadmium, lead, mercury, and arsenic by the population of Santiago (Chile) using a Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, **2005**, 43, 1647-1655.

- Nagar R., Sarkar D., Makris K. C., Datta R., Sylvia V. L. Bioavailability and bioaccessibility of arsenic in a soil amended with drinking-water treatment residuals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **2009**, 57, 755-766.
- Nakazato T., Taniguchi T., Tao H., Tominaga M., Miyazaki A. Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hybri-de generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2000**, 15, 1546-1552.
- Nriagu J. O., Lin T. S. Trace metals in wild rice sold in the United States. *Science of the Total Environment*, **1995**, 172, 223-228.
- Oomen G. A., Hack A., Minekus M., Zeijdner E., Cornelis C., Schoeters G., Verstraete W., Van de Wiele T., Wragg J., Rempelberg C. J. M., Sips A. J. A. M., Van Wijnen J. H. Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology*, **2002**, 36, 3326-3334.
- Ortiz A.I., Solís L. El arroz en Bolivia. Ana Isabel Ortiz y Lorenzo Solís. Cuadernos de Investigación 67. CIPCA **2007**. La Paz. ISBN. 978-99954-35-04-2. DL. 4-1-2196-07.
- Pal A., Chowdhury U. K., Mondal D., Das B., Nayak B., Ghosh A., Maity S., Chakraborti D. Arsenic burden from cooked rice in the population of arsenic affected and nonaffected areas and Kolkata city in West-Bengal, India. *Environmental Science and Technology*, **2009**, 43, 3349-3355.

- Patel K. S., Shrivastava K., Brandt R., Jakubowski H., Corns W., Hoffmann P. Arsenic contamination in water, soil, sediment and rice of central India. *Environmental Geochemistry and Health*, **2005**, 27, 131-135.
- Pawlik-Skowrońska B. Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology*, **2001**, 52, 241-249.
- Pawlik-Skowrońska B., Pirszel J., Brown M. T. Concentrations of phytochelatins and glutathione found in natural assemblages of seaweeds depend on species and metal concentrations of the habitat. *Aquatic Toxicology*, **2007**, 83, 190-199.
- Perelló G., Martí-Cid R., Llobet J. M., Domingo J. L. Effects of various processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury and lead in foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2008**, 56, 11262-11269.
- Phuong T. D., Chuong P. V., Khiem D. T., Kokot S. Elemental content of Vietnamese rice Part 1. Sampling, analysis and comparison with previous studies. *Analyst*, **1999**, 124, 553-560.
- Pizarro I., Gómez M., Palacios M. A., Cámara C. Evaluation of stability of arsenic species in rice. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2003**, 376, 102-109.
- Producción de arroz en Entre Ríos, **2010**.  
<http://www.entrieriostotal.com.ar/agropecuaria/arroz/arroz.htm>.

- Querol X., Alastuey A., Rodríguez S., Plana F., Mantilla E., Ruiz C. R. Monitoring of PM10 and PM2.5 ambient air levels around primary anthropogenic emissions. *Atmospheric Environment*, **2001**, 35, 845-858.
- Querol X., Minguillón M. C., Alastuey A., Monfort E., Montilla E., Sanz M. J., Sanz F., Roig A., Renau A., Felis C., Miró J. V., Artiñano B. *Atmospheric Environment*, **2007**, 41, 1026-1040.
- Rahman M. A., Hasegawa H., Rahman M. A., Rahman M. M., Miah M. A. M. Influence of cooking method on arsenic retention in cooked rice related to dietary exposure. *Science of the Total Environment*, **2006**, 370, 51-60.
- Rahman M.M., Owens G., Naidu R. Arsenic levels in rice grain and assessment of daily dietary intake of arsenic from rice in arsenic-contaminated regions of Bangladesh-implications to groundwater irrigation. *Environmental Geochemistry and Health*, **2009**, 31, 179-181.
- RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed. European Food Safety Authority), **2010**.  
[http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm).
- Reilly C. The persistent contaminants: lead, mercury, cadmium. En: Metal Contamination of Food. Its significance for food quality and human health. Blackwell Science Ltd. **2002**, capítulo 1, p. 81.

- Robinson G. R., Ayuso R. A. Use of spatial statistics and isotopic tracers to measure the influence of arsenical pesticide use on stream sediment chemistry in New England, USA. *Applied Geochemistry*, **2004**, *19*, 1097-1110.
- Rodellar S., Fontcuberta M., Arques J. F., Calderon L., Ribas Barba L., Serra-Majem L. L. Mercury and methylmercury intake estimation due to sea food products for the Catalanian population (Spain). *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2010**, *27*, 39-45.
- Rodríguez R. R., Basta N. T., Casteel S. W., Pace L. W. An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and soils media. *Environmental Science and Technology*, **1999**, *33*, 642-649.
- Rodríguez R. R., Basta N. T., Casteel S. W., Armstrong F. P., Ward D. C. Chemical extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and soil media. *Journal of Environmental Quality*, **2003**, *32*, 876-884.
- Rooney J. P. K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*, **2007**, *234*, 145-156.
- Rosenberg E. The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, **2003**, *1000*, 841-889.

- Roychowdhury T., Tokunaga H., Ando M. Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India. *Science of the Total Environment*, **2003**, 308, 15-35.
- Rubio C., Gutiérrez A., Burgos A., Hardisson A. Total dietary intake of mercury in the Canary Islands, Spain. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2008**, 25, 946-952.
- Ruby M. V., Davis A., Schoof R., Eberle S., Seelstone C. M. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science and Technology*, **1996**, 30, 422-430.
- Rudy, M. Chemical composition of wild boar meat and relationship between age and bioaccumulation of heavy metals in muscle and liver tissue. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2010**, 27, 464-472.
- Rupérez P., Saura-Calixto F. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology*, **2001**, 212, 349-354.
- S.A.G.P. y A. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos). Dirección de Agricultura. Argentina. **2010**. Consumo de arroz en Argentina. Análisis de la cadena de Arroz para Consumo. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/alimentos/inicio.htm>.

- Sahuquillo I., Lagarda M. J., Silvestre M. D., Farré R. Methylmercury determination in fish and seafood products and estimated daily intake for the Spanish population. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **2007**, 24, 869-876.
- Sánchez-Rodas D., Sánchez de la Campa A. M., De la Rosa J. D., Oliveira V., Gómez-Ariza J. L., Querol X., Alastuey A. Arsenic speciation of atmospheric particulate matter (PM10) in an industrialised urban site in southwestern Spain. *Chemosphere*, **2007**, 66, 1485-1493.
- Sanz E., Muñoz-Olivas R., Cámara C. A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 535, 227-235.
- SAS Institute Inc, SAS/STAT 9.2 User's Guide. Cary, NC, USA, **2008**.
- Schelwald R. A. BARGE, Bioavailability Research Group Europe: European Co-ordination on risk assessment of soils. Land Contamination & Reclamation 9, **2001**, 107-108. <http://www.nicole.org/nicole2/news/ann137j.pdf>.
- Schoof R. A., Nielsen J. B. Evaluation of methods for assessing the oral bioavailability of inorganic mercury in soil. *Risk Analysis*, **1997**, 17, 545-555.
- Schoof R. A., Yost L. J., Crecelius E. A., Irgolic K., Goessler W., Guo H. R., Greene H. Dietary arsenic intake in Taiwanese district with elevated arsenic in drinking water. *Human and Ecological Risk Assessment*, **1998**, 4, 117-135.

- Schoof R. A., Yost L. J., Eickhoff J., Crecelius E. A., Cragin D. W., Meacher D. M., Menzel D. B. A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37, 839-846.
- Schroder J. L., Basta N. T., Si J. *In vitro* gastrointestinal method to estimate relative bioavailable cadmium in contaminated soil. *Environmental Science and Technology*, **2003**, 37, 1365-1370.
- Sengupta M. K., Hossain M. A., Mukherjee A., Ahamed S., Das B., Nayak B., Pal A., Chakraborti D. Arsenic burden of cooked rice: Traditional and modern methods. *Food and Chemical Toxicology*, **2006**, 44, 1823-1829.
- Shih F. F. An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung Food*, **2003**, 47, 420-424.
- Shim S. M., Ferruzzi M. G., Kim Y. C., Janle E. M., Santerre C. R. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*, **2009**, 112, 46-50.
- Shiomi K. Arsenic in marine organisms: chemical forms and toxicological aspects. En: Arsenic in the environment. Part II: human health and ecosystems effects. Nriagu J., O. Ed. John & Sons, Inc. New York, USA, **1994**, capítulo 12, p. 261.
- Sirot V., Guérin T., Volatier J. L., Leblanc J. C. Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. *Science of the Total Environment*, **2009**, 407, 1875-1885.



- Sivaperumal P., Sankar T. V., Viswanathan Nair P. G. Heavy metal concentrations in fish, shellfish products from internal markets of India vis-a-vis international standards. *Food Chemistry*, **2006**, *102*, 612-620.
- Sloth J. J., Larsen E. H., Julshamn K. Survey of inorganic arsenic in marine animals and marine certified reference materials by anion exchange high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, *53*, 6011-6018.
- Sloth J. J., Julshamn K. Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian fiords: revelation of unusual high levels of inorganic arsenic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, *56*, 1269-1273.
- Smedley P. L., Nicolli H. B., Macdonald D. M. J., Kinniburgh D. G. Arsenic in groundwater and sediments from La Pampa province, Argentina. Arsenic contamination, speciation and environmental consequences in the Bolivian Plateau. En: Natural arsenic in groundwaters of Latin America, **2009**, chapter 3, pp. 35-45. Taylor and Francis Group, London, UK.
- Smith A. H., Goycolea M., Haque R., Biggs M. L. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *American Journal of Epidemiology*, **1998**, *147*, 660-669.

- Smith N. M., Lee R., Heitkemper D. T., DeNicola Cafferky K., Haque A., Henderson A. K. Inorganic arsenic in cooked rice and vegetables from Bangladeshi households. *Science of the Total Enviroment*, **2006**, 270, 294-301.
- Sonne C., Aspholm O., Dietz R., Andersen S., Berntssen M. H. G., Hylland K. A study of metal concentrations and metallothionein binding capacity in liver, kidney and brain tissues of three Arctic seal species. *Science of the Total Enviroment*, **2009**, 407, 6166-6172.
- Souliman S., Blanquet S., Beyssac E., Cardot J. M. A level A *in vitro/in vivo* correlation in fasted and fed states using different methods. Applied to solid immediate release oral dosage form. *The European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2006**, 27, 72-79.
- Storelli M. M., Marcotrigliano G. O. Total mercury levels in muscle tissue of swordfish (*Xiphias gladius*) and bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean Sea (Italy). *Journal of Food Protection*, **2001**, 64, 1058-1061.
- Storelli M. M., Giacominielli-Stuffler R., Storelli A., Marcotrigliano G. O. Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: A comparative study. *Marine Pollution Bulletin*, **2005**, 50, 993-1018.
- Storelli M. M., Barone G., Piscitelli G., Marcotrigliano G. O. Mercury in fish: Concentration vs. fish size and estimates of mercury intake. *Food Additives and Contaminants*, **2007**, 24, 153-157.

- Stybło M., Del Razo L. M., Vega L., Germolec D. R., LeCluyse E. L., Hamilton G. A., Reed W., Wang C., Cullen W. R. Thomas D. J. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of Toxicology*, **2000**, 74, 289-299.
- Sun G. X., Williams P. N., Carey A. M., Zhu Y. G., Deacon C., Raab A., Feldmann J., Islam R. M., Meharg A. A. Inorganic arsenic in rice bran and its products are an order of magnitude higher than in bulk grain. *Environmental Science and Technology*, **2008**, 42, 7542-7546.
- Sun G-X., Williams P. N., Zhu Y-G., Deacon C., Carey A.-M., Raab A., Feldmann J., Meharg A. A. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. *Environment International*, **2009**, 35, 473-475.
- Súñer M. A., Devesa V., Muñoz O., Vélez D., Montoro R. Application of column switching in high-performance liquid chromatography with on-line thermo-oxidation and detection by HG-AAS and HG-AFS for the analysis of organoarsenical species in seafood samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2001**, 16, 390-397.
- Súñer M. A., Devesa V., Clemente M. J., Vélez D., Montoro R., Urieta I., Jalón M., Macho M. L. Organoarsenical species contents in fresh and processed seafood products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2002**, 50, 924-932.

- Súñer M. A. Estudio sobre el arsénico, mercurio y sus formas químicas en productos de la pesca destinados al consumo humano. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universitat de València, **2005**.
- Urieta I., Jalón M., Eguileor I. Food surveillance in the Basque Country (Spain) II: Estimation of the dietary intake of organochloride pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron, zinc through the Total Diet Study, 1990/91. *Food Additives and Contaminants*, **1996**, *13*, 29-52.
- U.S. EPA (US Environmental Protection Agency), **1999**. Integrated Risk Information System (IRIS) on Elemental Mercury. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/mercury.html>
- U.S. EPA (US Environmental Protection Agency), **2001**. Integrated Risk Information System (IRIS). List of IRIS substances. Methylmercury. Washington, DC. <http://www.epa.gov/iris/subst/0073.htm>.
- U.S. EPA (US Environmental Protection Agency), **2010**. Basic information about mercury (inorganic) in drinking water. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/mercury.cfm>.

- Van de Wiele T. R., Oomen A. G., Wragg J., Cave M., Minekus M., Hack A., Cornelis C., Rompelberg C. J. M., De Zwart L. L., Klinck B., Van Wijnen J., Verstraete W., Sips A. J. A. M. Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **2007**, 42, 1203-1211.
- Varela G., Moreiras O., Carbajal A., Campo M. Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación 1991. Encuesta de Presupuestos Familiares 1990/91. Tomo I. INE. Madrid, **1995**.
- Versantvoort C. H. M., Van de Kamp E., Rompelberg C. J. M. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. RIVM report 320102002/2004. National Institute for Public Health and the Environment, The Netherlands, **2004**.
- Verwei M., Freidig A., Havenaar R., Groten J. P. Predicted serum folate concentrations based on *in vitro* studies and kinetic modelling are consistent with measured folate concentrations in humans. *Journal of Nutrition*, **2006**, 136, 3074-3078.
- Virtanen J. K., Rissanen T. H., Voutilainen S., Tuomainen T. P. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2007**, 18, 75-85.

- Waisberg M., Black W. D., Waisberg C. M., Hale B. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Ostinata). *Food and Chemical Toxicology*, **2004**, 42, 835-842.
- Wang S., Mulligan C. N. Occurrence of arsenic contamination in Canada: sources, behaviour and distribution. *Science of the Total Environment*, **2006**, 366, 701-721.
- WHO (World Health Organization), **1989**. Toxicological Evaluations of Certain Food Additives and Contaminants, 33rd Report of the JECFA, WHO Food Additives Series No. 24, Geneva.
- WHO (World Health Organization), **1990**. Methylmercury, Environmental Health Criteria No. 118, World Health Organization, Geneva.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc118.htm>.
- WHO (World Health Organization), **2001a**. Arsenic and arsenic compounds, Environmental Health Criteria No. 224, World Health Organization, Geneva.  
[http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO\\_EHC\\_224.pdf](http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_224.pdf).
- WHO (World Health Organization), **2001b**. Air Quality Guidelines for Europe, 2nd ed. WHO Regional Publications, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- WHO (World Health Organization), **2003**. Summary and conclusions of the sixty-first Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Rome, Italy, 10-19 June. JECFA/61/SC, pp.- 18-22. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf>.

- WHO (World Health Organization), **2004**. Guidelines for Drinking-Water Quality, Vol. 1. Recommendations. Third Edition, WHO, Geneva.  
<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546387.pdf>.
- WHO (World Health Organization), **2005**. Mercury in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva.  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/mercuryfinal.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/mercuryfinal.pdf).
- WHO (World Health Organization), **2007**. Exposure to mercury: a major public concern. World Health Organization, Geneva, Switzerland.  
<http://www.who.int/phe/news/Mercury-flyer.pdf>.
- WHO, (World Health Organization), **2008a**. Guidelines for Drinking-Water quality. Third edition. Incorporating the first and second Addenda. Volume 1. Recommendations. World Health Organization, Geneva, Switzerland.  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/fulltext.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf).
- WHO (World Health Organization), **2008b**. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. UNEP Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, Geneva, Switzerland.  
<http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/chem./mercury/en>.

- WHO (World Health Organization), **2010**. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA). Seventy-second meeting, Rome, 16-25 February 2010. Summary and conclusions, Issued 16<sup>th</sup> March 2010.  
[http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72\\_rev.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf).
- Wilhelm M., Wittsiepe J., Schrey P., Lajoie-Junge L., Bush V. Dietary intake by children from a German North Sea island using duplicate portion sampling. *Journal of Trace Elements*, **2003**, *17*, 123-132.
- Williams P. N., Price A. H., Raab A., Hossain S. A., Feldmann J., Meharg A. A. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science and Technology*, **2005**, *39*, 5531-5540.
- Williams P.N., Islam M.R., Adomako E.E., Raab A., Hossain S.A., Zhu Y.G., Feldmann J., Meharg A.A. Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters. *Environmental Science and Technology*, **2006**, *40*, 4903-4908.
- Williams P. N., Raab A., Feldmann J., Meharg A. A. Market Basket Survey shows elevated levels of As in South Central U.S. processed rice compared to California: Consequences for human dietary exposure. *Environmental Science and Technology*, **2007**, *41*, 2178-2183.



- Wragg J., Cave M. R. *In-vitro* methods for the measurement of the oral bioaccessibility of selected metals and metalloids in soils. A critical review. R&D Technical Report P5-062. ISBN 1857059867. **2002**. [http://www.environmentagency.gov.uk/static/documents/Research/p5\\_062\\_tr01\\_1284167.pdf](http://www.environmentagency.gov.uk/static/documents/Research/p5_062_tr01_1284167.pdf).
- Xie Z. M., Huang C. Y. Control of arsenic toxicity in rice plants grown on an arsenic-polluted paddy soil. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, **1998**, 29, 2471-2477.
- Yoo M. J. Y., Chen X. D. GIT Physicochemical Modeling. A Critical Review. *International Journal of Food Engineering*, **2006**, 2, Article 4.
- Yost L. J., Schoof R. A., Aucoin R. Intake of inorganic arsenic in the North American diet. *Human and Ecological Risk Assessment*, **1998**, 4, 137-152.
- Yusà V., Suelves T., Ruiz-Atienza L., Cervera M. L., Benedito V. Pastor A. Monitoring programme on cadmium, lead and mercury in fish and seafood from Valencia, Spain: levels and estimated weekly intake. *Food Additives and Contaminants: Part B*, **2008**, 1, 22-31.
- Zavala Y. I., Duxbury J. M. Arsenic in rice: I. Estimating normal levels of total arsenic in rice grain. *Environmental Science and Technology*, **2008**, 42, 3856-3860.
- Zavala Y. I., Gerads R., Gürleyük H., Duxbury J. M. Arsenic in rice: II. Arsenic speciation in USA grain and implications for human health. *Environmental Science and Technology*, **2008**, 42, 3861-3865.

Zhai C. K., Jiang X. L., Xu Y. S. Studies of the safety of Chinese wild rice. *Food and Chemical Toxicological*, **1996**, 34, 347-352.

Zhu Y.-G., Sun G-X., Lei M., Teng M., Liu Y.-X., Chen N.-C., Wang, L.-H., Carey A. M., Deacon C., Raab A., Meharg A. A., Williams P.N. High percentage inorganic arsenic content of mining impacted and nonimpacted chineser ice. *Environmental Science and Technology*, **2008**, 42, 5008-5013.